

B. 1305

A NUKLEINSAVANYAGCSERE NÉHÁNY SAJÁTSÁGA DOHÁNYMOZAIK

VIRUS FERTŐZÖTT DOHÁNY LEVÉLBEN

Erdei Sára

MTA - SZBK

S Z E G E D

1976



TARTALOMJEGYZÉK

oldal

Rövidítések	
Bevezetés	
I. Elméleti rész	
A. a/ A dohánymozaik vírus jellemzése	1
b/ A dohánymozaik vírus és a gazda kapcsolata	3
B. A zab levél nukleázai	8
II. Kísérleti rész	
I. Kísérleti anyagok	12
II. Kísérleti módszerek	13
A. A nukleázok jellemzése	13
B. A nukleinsavak jellemzése	20
III. A kísérletek leírása	26
A. A nukleázok jellemzése	
1. Avena nukleázok	26
2. Fertőzött és egészséges dohány nukleázai	30
B. A dohánymozaik vírusfertőzés és a gazda rRNS szintézise	
1. Az egészséges növény rRNS szintézise	36
2. A fertőzött növény rRNS szintézise . .	39
III. Következtetések	46
Irodalomjegyzék	56

RÖVIDÍTÉSEK

DMV	-	Dohánymozaik virus
DNáz	-	Dezoxiribonukleáz
RNáz	-	Ribonukleáz
rRNS	-	Riboszomális ribonukleinsav
DEP	-	Dietilpirokarbonát
SDS	-	Nátrium-dodecilszulfát
TNS	-	Tris-izopropil-naftalén szulfonát
PAS	-	Para-aminoszalicilát
NEPES	-	2-/N-2-hidroxiethylpiperazin-N'-il/ /etan szulfonsav
PPO	-	2,5-difeniloxazol
POPOP	-	1,4-bis-/5-feniloxazol-2-il/benzol
EDTA	-	Etiléndiamintetraecetsav
AMP	-	Adenozinmonofoszfát
GMP	-	Guanozinmonofoszfát
DTT	-	Dithiothreitol

Ezuton szeretnék köszönetet mondani Dr. Farkas Gábor igazgatónak, hogy intézetében biztosította a feltételeket munkám elvégzésére. Megköszönöm Dr. Farkas Gábor támogatását és utmutatását a kísérleti munkában, valamint segítségét, és irányítását az eredmények értékelésében és megírásában.

Köszönetem szeretném kifejezni a Növény-életteni Intézet, Anyagcsereéletteni Csoportjában dolgozó kutatóknak és asszisztens kollegáknak.

A dohánymozaikvirus lényeges változásokat okoz a gazdanövény anyagcseréjében, amelyek egyik gyökerét a fertőzés következtében módosult fehérje és nukleinsav anyagcserében kell keresnünk.

A nukleinsav anyagcserében lényeges szerepet játszanak a különböző specificitású nukleázok, és a vírus jelenléte miatt létrejövő biokémiai változások közül az egyik legszembevetőbb a gazda össznukleáz aktivitásának a megnövekedése. Ezért kísérleteink egyik céljaként ennek a jelenségnek az elemzését tűztük ki.

Mivel munkacsoportunk korábbi eredményei alapján kiderült, hogy a növényi nukleázok tanulmányozására az egyik legalkalmasabb objektum a zab primer levele, először e növény nukleázainak a jellemzését, tisztítását akartuk befejezni. E rendszer ismeretében könnyebbnek tűnt a dohánylevél nukleázainak a tanulmányozása, különös tekintettel azok szerepére a vírus fertőzés utáni nukleinsav anyagcseré megváltozásában.

Másfelől fontosnak látszott, hogy a lebontást végző enzimek vizsgálatával párhuzamosan megnézzük, miképpen alakul a nukleinsavak, elsősorban a riboszomális RNS-ek szintézise a vírusfertőzést követően. Így kísérleteink második felében erre a problémára összpontosítottuk a figyelmünket.

I.

ELMÉLETI RÉSZ

A.

a/ A dohánymozaikvirus jellemzése

A dohánymozaikvirus az egyszerű felépítésű, kis méretű növényi vírusok csoportjába tartozik. A 280 nm nagyságu, pálcika alakú részecskét egy egyes szálu RNS molekula, és a helikális szimmetria szerint köréje rendeződött, monomerekből álló fehérjeburok alkotja.

A 2×10^6 d nagyságu RNS a növényi sejtbe jutva kettős funkciót lát el. Egyrészt a saját reprodukciójához mintául szolgál, másrészt mRNS-ként irányítja a vírus specifikus fehérjék szintézisét.

Szerkezetéről ismert, hogy 3' végén CCA_{OH} -val végződő, tRNA-hez hasonló, hisztidin akceptor aktivitást mutató szekvenciát tartalmaz /33/. Az utolsó 71 nukleotid szekvenciája ismeretében /18/ azonban nem sikerült valószínűsíteni a transzfer RNS-ekre jellemző térszerkezet kialakulását /58/. Az RNS bakteriofágok 3' végét szintén CCA_{OH} alkotja, míg az állati RNS vírusok poly(A) szekvenciával végződnek, amit a dohánymozaikvirus esetében nem sikerült kimutatni /17, 54/. 5' vége $m^7Gppp5'Gp$ végcsoportot visel /68/, ami az állati vírus és emlős mRNS-ek jellemzője.

Az RNS kb. 200 000 d fehérje kódolásához elegendő információt hordoz, a szerkezeti fehérje molekulasúlya ellenben mindössze 17 000 d. Feltehetően a többi rész az RNS rep-

likációjához szükséges fehérjét kódolja. Ezt támasztja alá, hogy a fertőzött levelekben és protoplasztokban a vírus RNS megjelenésével párhuzamosan, a szerkezeti fehérjék szintézise előtt kimutatható egy nagy molekulásulyu /135 000 - 195 000/ fehérje/k/ /66,52,46/, valamint, hogy sikerült fertőzött levélből izolálni DMV-ERNS függő, RNS-t szintetizáló enzimet /65,53/.

Az RNS replikációja dupla szálú replikatív forma /RF/ és replikatív intermedierék /RI/ képződése révén történik, valószínűleg citoplazmatikus membránokhoz kötötten /25, 26, 43/.

A fehérjék szintézisének a pontos mechanizmusa nem tisztázott. Egyes szerzők véleménye szerint /46/ a picorna vírusoknál leirthez hasonlóan, az RNS monocisztronos messengerként íródik át, míg mások az RNS bakteriofágoknál megfigyelt, policisztronos messenger regulált transzlációját feltételezik /52/. A fehérjeszintézis a citoplazmatikus, 80S riboszómákon történik, miként erre a cikloheximid gátlásból és a kloramfenikol érzéketlenségéből következtetni lehet /65, 37/.

A DMV részecskék kialakulásának a helyéül kezdetben a sejtmagot és a kloroplasztokat jelölték meg, majd a fejlettebb elektronmikroszkópos és részletesebb biokémiai jellemzés elvetette ezt az elképzelést, Ma már tudjuk, hogy legalábbis a "vulgare" és a "flavum" DMV-törzsek esetében az új vírus a citoplazmában képződik /43/.

A fentiekből látható, hogy a DMV felépítése, szaporodási módja bizonyos vonatkozásban az RNS bakteriofágokhoz hasonló, míg más tekintetben az állati RNS vírusokkal visel közös jegyeket.

b/ A dohánymozaik vírus és a gazda kapcsolata

1/ Virusgazda rendszerek

A vírus tipikus gazdanövénye a dohány, de a Solanaceae család többi tagját és még 24 család más fajait is képes fertőzni.

A vírusfertőzés két típusa különböztethető meg:

/a/ Szisztémikus fertőzés

Az elsődlegesen inokulált levélből a vírus a szállítóyalábok és a sejtek közötti összeköttetések révén a növény minden levelébe eljut. A felső leveleken kétféle tünet alakulhat ki, aszerint, hogy azok milyen idők a virussal való találkozáskor. Ha az alsó levelek inokulálásakor a felső levél 1.5 cm-nél nagyobb, "vein-clearing" szimptoma, az 1.5 cm-nél kisebb, illetőleg a később fejlődő leveleken viszont mozaikos szimptoma jön létre.

felső levél
az alsó
inokulálásakor

szimptoma

0.5 cm

mozaik

sárga szigetek
megjelenése

1.5 cm

"vein-clearing"

az erek mentén
elsárgulás

/b/ hiperszenzitiv reakció

Az inokulált levelek sejtjei a vírus szaporodásának a következtében elhalnak, és nekrotikus léziók keletkeznek. A vírus nem terjed tovább, és csak az inokulált levelek maradnak fertőzöttek. A léziók száma arányos a sejtbe jutott virussal, így annak mennyiségi meghatározására alkalmas.

Kezdetben a vírusfertőzés sajátosságait csak ép növényen lehetett tanulmányozni. Ennek két legfőbb hátránya, hogy nem lehetett a sejteket szinkron fertőzni, és nagyon nagy a fertőzetlen sejtek okozta háttér. Később lehetővé vált, kallusz és sejtkulturák fertőzése, de a nagy áttörést a protoplasztok felhasználása fogja jelenteni.

A DMV-fertőzés legfontosabb, sajátos vonásait a következőkben foglalhatjuk össze:

/a/ a sikeres fertőzés előfeltétele a levél felületének a bedörzsölése. Valószínű a kutikula réteg és a sejtfa sérülése nélkül a vírus nem tud a sejtekbe bejutni.

/b/ a fertőzés határfoka igen rossz, optimális körülmények között is 10^4 - 10^5 részecske szükséges a kiváltásához sejtenként. Az alacsony efficiencia oka nem ismert, és különös, hogy a protoplasztok fertőzésekor is hasonló /57/.

/c/ A rossz fertőzési határfok ellenére valószínűleg egyetlen részecske szükséges a fertőzéshez /ezt a plaque-assay matematikai elemzése mutatja/.

2. A fertőzés okozta biokémiai változások a gazda-szervezetben.

A virusfertőzést követő változások, egészen leegyszerűsítve, két dologra vezethetők vissza.

- A vírus a saját reprodukciójához a gazda RNS és fehérje szintetizáló rendszerét használja fel, így a gazda károsodását kiválthatja a korábban szintetizálódott nukleinsavaknak és fehérjéknek, vagy a vírus által felhasznált prekursoroknak a hiánya.
- A vírusnak, mint idegen strukturának, nukleinsavnak és fehérjének a jelenléte citopatikus /tehát indirekt/ elváltozásokat okozhat, de esetleg különböző biokémiai folyamatokra közvetlenül gátló vagy serkentő hatást is fejthet ki.

A DMV-gazda rendszer előzőleg említett jellemzői mellett a gazda szervezet felépítése is nehezítette a fertőzés következményeinek a részletes biokémiai elemzését. Az eddig megfigyelt jelenségek azt mutatják, hogy a fertőzésnek általános kísérője a szintetikus folyamatoknak a lelassulása, illetőleg a lebontási reakcióknak a fokozódása. /A fotoszintézis sebessége, a légzés intenzitása, bizonyos enzimek aktivitása fokozódik pl. polifenoloxidáz, ribonukleáz/.

Mivel az anyagcserében kulcsfontosságú szerepet töltenek be a nukleinsavak és a fehérjék, a fertőzés utáni jelenségek megértése szempontjából döntő, hogy miként változik

meg ezeknek a makromolekuláknak a szintézise, illetőleg a lebontása. Ennek ismerete a fertőzéssel járó többi folyamat értelmezéséhez is nagyon fontos támpontot és kiindulási alapot jelenthet.

A dohánymozaikvirushoz hasonló szerkezetű RNS bakteriofágok és állati RNS-virusok nagy részénél a fertőzés kezdeti eseménye a gazda RNS és fehérjeszintézisének a leállítása.

Az RNS bakteriofágok közül az R 17, R 23, ZIK/1 fertőzés esetén a bakteriális fehérje és rRNS képződésének a nagyfokú gátlását figyelték meg /10,22,60,69/. Mutánsokkal végzett kísérletek alapján úgy tűnik, hogy különböző úton történhet a rRNS szintézisének a blokkolása. Egyes kísérletek arra mutatnak, hogy a gátláshoz szükséges a vírus polimeráz képződése /56/, míg máskor olyan esetben is ki tudták mutatni, amikor UV-sugárzott fággal, vagy EDTA jelenlétében /gátolja a fág bejutását/ végezték a fertőzést /60,69/.

A picorna vírus - a DMV-hoz hasonló felépítésű állati RNS vírus - fertőzés is drámaian megváltoztatja a gazda rRNS szintézisét. Itt is többféle mechanizmus révén valósulhat meg a rRNS szintézis gátlása. Egyrészt megfigyelték, hogy a vírus a 45S rRNS prekursor képződésének a csökkenését okozta, de interferált a riboszóma képződés későbbi lépéseivel is, amit nem lehetett egyszerűen a fehérjeszintézis gátlás másodlagos következményének tekinteni /38,9/.

Mivel az RNS szintézis gátlás nem jön létre, ha a virust UV-sugarakkal kezeli, vagy a virus-fehérjeszintézist megbénították, valószínű, hogy az valamilyen virus specifikus fehérje közvetítése révén valósul meg /13/.

Összefoglalva, a gazda RNS szintézisének lényeges megváltozása, valóban a virusfertőzésnek egyik döntő következménye lehet, azonban ennek a mechanizmusa változhat, nemcsak a különböző virus-gazda rendszerekben, hanem az azonos típusu virusok csoportján belül is.

Mivel a DNS, mint virus sok tekintetben az RNS-bakteriofágokhoz hasonló, gazdája viszont mint eukariota szervezet az állati virus-rendszerekkel mutat hasonlóságot, fontosnak tűnt megnézni, hogy a fertőzés korai és egyik elsődleges következménye-e a rRNS szintézis leállása. Ezen kívül fokozta még a kérdés érdekességét, hogy egyetlen növényi sejtben mind a bakteriális /kloroplaszt/, mind az eukariota RNS-és fehérje szintetizáló rendszer, legalábbis annak bizonyos elemei, egyidejűleg vannak jelen, így a növény-virus kölcsönhatásnak többféle lehetősége adott. Más szerzők korábbi eredményei is arra utaltak, hogy a növényi virusok esetén is az egyik legjellemzőbb változás a rRNS-ek szintézisének a leállása. Ezek a kísérletek azt mutatták, hogy elsősorban a kloroplaszt rRNS szintézise, és a kloroplaszt riboszómák fehérjeszintetizáló kapacitása csökken a fertőzött levelekben /1,2,14,15,16,21,40,45/.

A DMV-fertőzés után nemcsak a rRNS szintézis leállítását, hanem a nukleinsavakat bontó enzimek működésének az egyidejű

fokozódását is megfigyelték. Erre következtetni lehetett a fokozott nukleinsav degradációból /14/, másrészt közvetlenül kimutatták a fertőzést követően a ribonukleáz aktivitás megnövekedését /11,35/.

Ahhoz, hogy megállapíthassuk mi a pontos szerepe a fertőzés után létrejövő magas ribonukleáz aktivitásnak, először meg kellett ismernünk a dohány levélben található nukleinsavakat bontó enzimeket.

Munkacsoportunk előző munkája alapján kitűnt, hogy a növényi nukleázok tanulmányozására az egyik legmegfelelőbb rendszer a zab primer levele. A zabban lévő enzimek alapos ismerete lényegesen megkönnyítette az összetettebb dohánylevél nukleázainak a jellemzését. A dohányval szemben a zabnak a nukleázok tisztítása tekintetében két döntő előnye van:

/a/: egyenletesen növekvő levelei vannak;

/b/. nem tartalmazza a dohányban nagy mennyiségben jelenlévő polifenolokat.

B.

A zab-levél nukleázai

A fiatal zab levél foszfát-észter kötést hasító enzimeinek sajátosságait foglalták össze a korábbi közlemények /58, 62/.

A fiatal zab levél kivonatában kimutatható savas- lúgos fosz-

fodieszteráz, foszfatáz és ribonukleáz aktivitás, amelyek Sephadex G-75 oszlopon végzett kromatográfia során elválaszthatók egymástól. A kromatográfia alapján kiderült, hogy a nyers kivonatban mérhető ribonukleáz aktivitás döntően egy, ezen az oszlopon homogén csucsként viselkedő ribonukleáznak tulajdonítható. Ezen kívül megfigyeltek 3 minor nukleázt, amelyek a nagyobb molekulásulynak megfelelő tartományban, és igen kis mennyiségben jelentkeztek az elválasztás során.

Enzimológiai jellemzés során a fő ribonukleáznak a következő sajátosságait állapították meg:

Endonukleáz, az egyes szálu RNS és ribo-homopolimerek foszfát észter kötéseit hasítja, a hidrolízis termékei 2',3'-ciklikus nukleotidok. Kis mértékben hidrolizálja a purin ciklikus nukleozid-foszfatokat, míg a pirimidin ciklikus nukleotidokat egyáltalán nem. /Az előbbieket nagy feleslegben gátolják az enzim aktivitását/.

Az enzim relatív purin-specificitást mutat, amit az alábbi tények támasztanak alá: a/ a hidrolízis első termékei a 2'3'-GMP és a 2'3'-AMP, b/ a homopolimerek közül preferenciálisan hasítja a poli/I/-t és a poli/G/-t, c/ végtermékgátlást csak a purin ciklikus nukleozid-foszfatok okoznak.

A fentiek alapján az enzimet relatív-guanin-specificus ribonukleáznak nevezték el, ami Wilson új csoportosításában /61/ a ribonukleáz I. nevet viselő enzimek csoportjába

ba tartozik, így a továbbiakban zab-RNáz-I-ként említjük. Az enzimaktivitás szintje megvilágítás, a szövetek sértése, ozmotikus sokk hatására nagy mértékben megemelkedik. Részletesen vizsgálták a levél levágásakor létrejövő RNáz aktivitás-növekedést. A sértéskor mérhető, nagyfokú RNáz aktivitás ugyanannak az enzimnek tulajdonítható /tisztítás során azonos viselkedés, azonos pH optimum, ionokkal szembeni azonos érzékenység/, és valószínűleg az enzim szintézisének a fokozódása okozza. /RNS, illetőleg fehérjeszintézis gátlók aktinomicin-D, 8-aza-adenin, puromicin, kloramfenikol jelenlétében nem jön létre az aktivitás-emelkedés. /3/.

Idősebb levelekben lényegesen megnő az egyik "minor" nukleáznak a mennyisége, így három hetes zab levél használatával lehetővé vált ennek az enzimnek a tisztítása, jellemzése is. Eltérő szubsztrát specificitása /DNS-t is hasít/ és molekulasúlya alapján jól elkülöníthető a fiatal levelek fő ribonukleázától, az RNáz-I-től.

Tulajdonságai az alábbiakban foglalhatók össze:

Endonukleáz, denaturált és natív DNS-t, RNS-t hidrolizál, a hidrolízis termékei 5'nukleotidok. Relatív adenin specificitására lehet következtetni abból, hogy a hidrolízis első termékei 5'AMP ill. 5'dAMP és hogy a homopolimerek közül preferenciálisan a poly/A/-t hasítja. Az enzim molekulasúlya 33 000, aktivitását a Mg alig befolyásolja,

EDTA, Cu^{++} gátolja, zink ionok az RNáz aktivitást gátolják, a DNáz aktivitásra nem hatnak.

Wilson osztályozása alapján zab nukleáz-I-nek nevezük a korábbi cukorra-nem specifikus nukleáz elnevezés helyett /3,1,4,9/.

A zab levél két fő nukleázának a tulajdonságait hasonlítja össze a következő táblázat /I. Táblázat/.

I. Táblázat

	Ribonukleáz I.	Nukleáz I.
Szubsztrát	RNS ciklikus 2'3'- nukleozid foszfát	RNS, DNS denaturált natív 3'nukleotidok
A hidrolizis termékei	2'3'ciklikus nukleozid foszfát	5'purin nukleozid foszfát
Bázis specificitás	G A U C	A G U C
pH optimum	5.5	5.5 - 6.0
Ion hatás	- Mg^{++} - EDTA - Zn^{++}	gátol nem hat alig hat gátol RNáz aktivitás gátlása
Enzim-szint	<u>fiatal levelekben</u> magas, sértés hatására + megvilágításra nő	<u>idős levelekben</u> magas
Előfordulása	oldható frakció	részecskékhez kötött

II.

KISÉRLETI RÉSZ

I. Kísérleti anyagok.

A zabot /Avena sativa/ üvegházban, homokkulturában neveltük.

A nukleinsav analízishez Nicotiana tabacum L. cv. "Samsun" dohány növényeket használtunk.

A fertőzés 1 mg/ml-es 0.01 M foszfát pufferben pH = 7 DMV-sal történt, az alsó 2-3 levél Celite-s bedörzsölésével. A kontrol növényeken a hasonló helyzetű leveleket, azonosan DMV-mentes pufferrel kezeltük.

A nukleinsav analízishez a felső leveleket használtuk, amelyek a következő fertőzési tüneteket mutatták:

"Vein clearing" - fertőzéskor a dohány 3-4 leveles állapotban volt, s a tünetek 3-4 nap múlva jelentek meg;

"mozaik-szimptoma" - fertőzéskor a dohány 8-lo leveles volt, és a tünetek 7-lo nap múlva váltak kifejezetté;

"átmeneti-mozaik" - idős, néhány hónapos növényeken, főleg télen, nagy, éles határokkal körülvett, zöld foltokkal megszakított mozaikok fejlődtek ki.

A nukleáz aktivitás vizsgálatát Nicotiana tabacum L., cv. Xanthi nc. növényeken végeztük. A fertőzés az előbbivel azo-

nos módon történt azzal a különbséggel, hogy csak a levél egyik felét inokuláltuk, és a másik felét használtuk kontrollként.

II. Kísérleti Módszerek

A. A Nukleázok jellemzése

Enzimaktivitás mérések

Ribonukleáz aktivitás meghatározása

Mértük a savoldható frakciónak az enzimátikus hidrolízis termékei által okozott fényelnyelés növekedését, 260 mμ hullámhossznál.

A 2 ml reakcióelegy tartalmazott: 3 mg élesztő RNS-t, 100 μmol Na-acetát /pH=5.5/ puffert, 0.1-0.5 ml enzimet. 37°C-on, 30 perces inkubáció után a hidrolízist 2.5 %-os TCA-ban oldott 0.3 % La/NO₃/₃-tal állítottuk le, a reakcióeleggyel azonos térfogatban. Egy órai hűtés után a csapadékot lecentrifugáltuk, és a megfelelő hígítás után meghatároztuk a felüluszó fényelnyelését 260 mμ-nál.

Dezoxiribonukleáz aktivitás meghatározása

A ribonukleáz méréshez hasonlóan végeztük, azzal az eltéréssel, hogy szubsztrátként csirkevér RNS-t használtunk.

Foszfatáz aktivitás meghatározása

A para-nitrofenilfoszfát /pNPP/ hidrolizisekor felszabaduló paranitrofenol abszorpcióját mértük 400 m μ hullámhossznál. A reakcióelegy 100 μ mol Na-Acetát pH=5.5 pufferből, 1 μ mol pNPP-ből és megfelelő mennyiségű enzimből állt. 37°C-on, 20 perc inkubálás után 1 ml 0.3 N NaOH-dal leállítottuk a reakciót, majd megfelelő hígítás után mértük a fényelnyelést 400 m μ -nál.

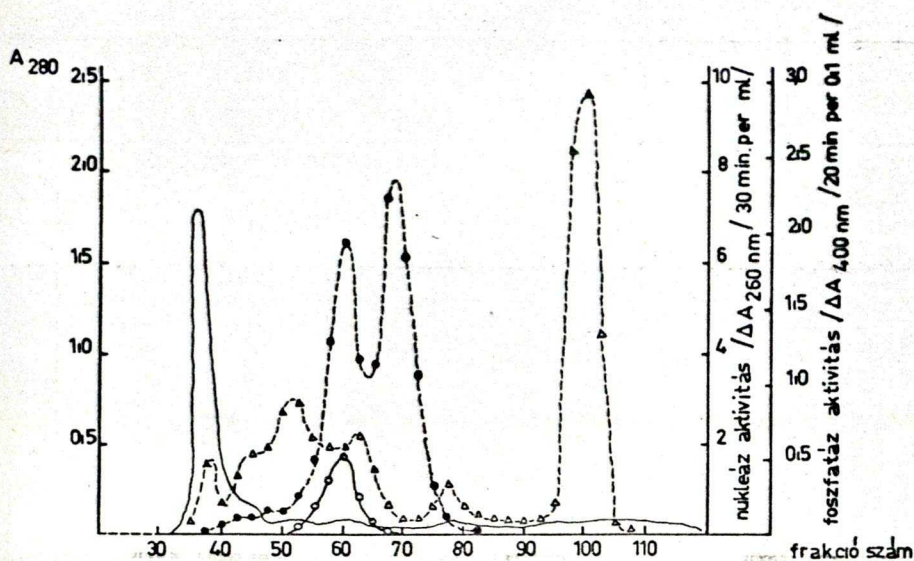
Foszfodieszteráz aktivitás meghatározása

A foszfatáz méréshez hasonlóan végeztük, kivéve, hogy szubsztrátként bis-para-nitrofenilfoszfátot /1 μ mol/ használtunk. A lugos foszfodieszteráz meghatározásánál a reakcióelegy 100 μ mol Tris-HCl, pH=8.8 puffert tartalmazott.

Nukleáz I. tisztítása

Háromhetes Avena sativa első levelét /40 g/ dörzsmozsárban, kis kvarchomokkal homogenizáltuk 0.05 M Tris-HCl pH=7.5 pufferben. /Az enzim tisztításhoz háromszoros /g/ml/, a nyers kivonatban történő enzimaktivitás mérés-

hez tízszeres arányban/. A szövetkivonatot négy réteg gézen átszűrtük, majd 30 percig, 10 000 g-vel, 4°C-on centrifugáltuk. A felülusztót szilárd ammóniumsulfáttal 80 %-ig telítettük, és három órai állás után centrifugáltuk / 80 00 g, 15 min/. A fehérje csapadékot 0.01 M Tris-HCl pH=7.5 pufferben /3 ml/ oldottuk és 2.4 cm x 100 cm Sephadex G-75 oszlopra rétegeztük, majd a fehérjéket ugyanezzel a pufferrel eluáltuk. /A kromatográfiát szobahőmérsékleten végeztük/. Néztük a frakciók fehérje tartalmát, valamint meghatároztuk a ribonukleáz, dezoxiribonukleáz, foszfátáz, lugos és savas foszfodieszteráz aktivitást. A DNáz és RNáz aktivitást egyaránt mutató frakciókat összegyűjtöttük, és 0.8 cm x 50 cm-es DEAE-cellulóz oszlopra vittük. /Az oszlopot 2 M /NH₄/₂CO₃ jelenlétében, kis nyomás alatt töltöttük meg, majd desztillált vízzel karbonátmentesre mostuk, és végül 0.01 M Tris-HCl pH=7.5 pufferrel equilibráltuk/. A minta felrétegzése után lineáris NaCl grádienssel /0-0.4 M NaCl , 0.01 M Tris-HCl pH=7.5 pufferben oldva/ eluáltuk a fehérjéket. /A kromatográfiát ezuttal 4°C-on végeztük/. Ismét a DNáz és RNáz aktivitást is tartalmazó frakciókat gyűjtöttük össze, egy éjszakán át dializáltuk 0.01 M Tris-HCl pH=7.5 pufferrel szemben majd liofilizálással töményítettük az enzimet. A tisztított enzim legalább három hónapig megőrizte az eredeti aktivitást. Az enzim tisztítás lépéseit, jellemzőit mutatják a következő ábrák /1. ábra, 2. ábra, 0II. Táblázat/.

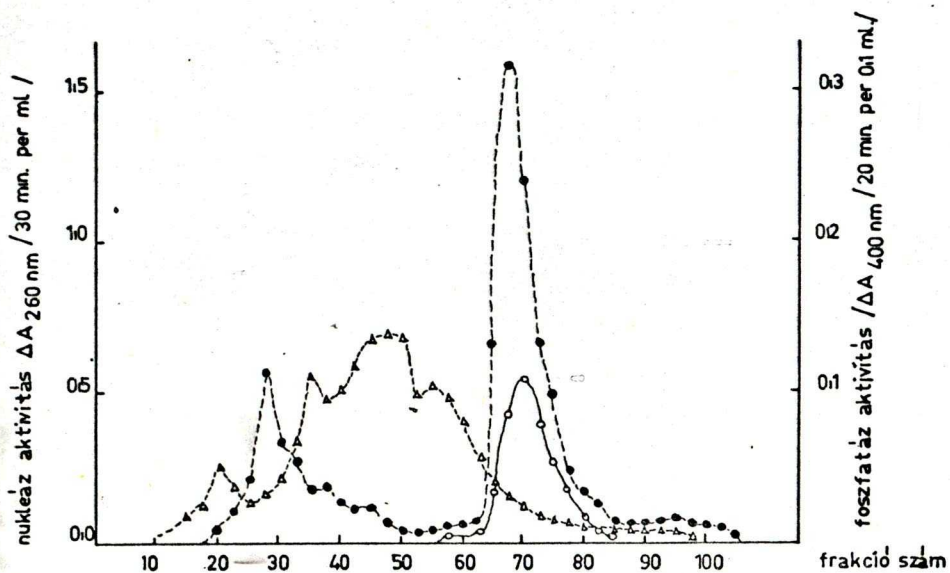


1. ábra: 21 napos Avena levél foszfát-észter kötést hasító enzimjeinek kromatográfiája Sephadex G-75 oszlopon.

A 40 g levél 0.05 M Tris-HCl pH=7.5 pufferrel készült nyers kivonatából, 80 %-os ammoniumsulfát telítéskor kapott csapadékot feloldottuk 3 ml 0.01 M Tris-HCl pH=7.5 pufferben, és Sephadex G-75 /2.4x100 cm/ oszlopra rétegeztük.

Az oszlopot 0.01 M Tris-HCl pH7.5 pufferrel mostuk, és 3 ml-es frakciókat gyűjtöttünk. Mértük a frakciót fehérje tartalmát A_{280} RNáz és DNáz, valamint foszfataz aktivitását.

- fehérje A_{280}
- RNáz aktivitás,
- DNáz aktivitás,
- Δ-Δ-Δ foszfataz aktivitás.



2. ábra: A 21 napos zab levél nukleáz I. enzimjének tisztítása ioncserélő kromatográfiával.

A Sephadex G-75 oszlopról lejövő, DNáz és RNáz aktivitást mutató frakciókat /52-62/ DEAE cellulóz oszlopra /0.8 cm x 50 cm/ rétegeztük és a fehérjét lineáris NaCl grádienssel /0-0.4 M/ eluáltuk. A frakciók térfogata 3 ml volt.

●---●---●---● RNáz aktivitás,
○---○---○---○ DNáz aktivitás,
△---△---△---△ foszfatáz aktivitás.



* II. Táblázat

Frakció	Térfogat ml	Össz- fehérje mg	Nukleáz aktivitás egység *	Specifikus aktivitás egység/mg *	Tisztítás foka	Hozam %
nyers kivonat	132	608	1929	3.1	1	100
Sephadex Ø 75 frakciók 52 - 62	33	17.6	830	47.2	15.2	43
DEAE cellulóz frakciók 63-76	12	0.7	273	390	126.6	14

A zab levél nukleáz I. enzimjének tisztítása. * - Kunitz egység.

A dohánymozaik vírus tisztítása

A vírus fertőzött, mozaikos leveleket szárazjégben megfagyasztva száraz porrá törtük, majd 0.1 M Na-foszfát pufferben pH=7 eldörzsöltük, és állandó keverés közben hagytuk 4°C-ig felmelegedni. A szuszpenziót 10 000 g-vel 30 percig centrifugáltuk. A feltároltan sejtektől, sejt-törmelékektől megtisztított felülusztót 80 000 g-vel 1 órán át centrifugáltuk. /BECKMAN L2 65B centrifuga, Ti40 rotor/. A csapadékot 0.1 M foszfát pufferben pH=7 egy éjszakán át állni hagytuk. Másnap megismételtük az alacsony, /10 000 g, 30 min/ és a magas /80 000 g, 60 min/ fordulatszámú centrifugálást és a foszfát pufferben való szuszpendálást. Mindaddig végeztük ezt a ciklusos tisztítást, amíg a vírus szuszpenzió nem lett teljesen pigment-mentes, és UV-fény-abszorpciós spektruma jellemző a dohánymozaik vírusára.

A dohánymozaik vírus mennyiségének a meghatározása

A vizsgált kivonat Celites szuszpenziójával bekentük 1.5 cm átmérőjű Xanthi nc. levélkorongok felületét. A korongokat Petri-csészében, nedves szűrőpapíron, megvilágítás mellett inkubáltuk, és 48 óra múlva számoltuk a kifejlődött léziókat.

Fehérje meghatározás

Folin reagenssel, Lowry módszere alapján végeztük, szérum albumint használva standardként.

B. A Nukleinsavak Jellemzése

Nukleinsav kivonás I. DEP-módszer /Solymosy et al. 1970,
55/

/Minden műveletet 4°C-on végeztünk/.

A növényi szövetet tízszeres /g/ml/ mennyiségű 0.05 M Tris-HCl, pH=7.6, 0.1 % SDS, 0.05 M MgCl₂ oldattal Virtis késes homogenizátorban, vagy Potterben, kétszer 20 mp-ig homogenizáltunk. Ezután 10 ml-ként 0.3 ml DEP-et adtunk a kivonathoz, és még egyszer maximális sebességgel homogenizáltuk. A DEP felesleget 5 perces, 37°C-os inkubálással, a sejttörmelékeket pedig 8 000 g, 15 perces centrifugálással távolítottuk el. A felüluszóhoz 10 ml-ként 1 g szilárd NaCl-t adtunk. Ismét 37°C-on, 5 percig inkubáltuk a kivonatot, majd a denaturálódott fehérjéket 10 000 g-vel, 20 percig ülepitettük. A nukleinsavakat tartalmazó felüluszóhoz 0.5 térfogat 0.3 M Na-acetátot és 2.5-szeres térfogat 96 %-os etanol elegyét öntöttük, s egy éjszakán át 4°C-on tartottuk.

A nukleinsav csapadékot centrifugálással összegyűjtöttük /10 000 g, 5 perc/, s a csapadékot 75 %-os etanollal kétszer mostuk. A csapadékot vagy közvetlenül az elektroforé-

zishez használt pufferben /2 g levél esetén 0.5 ml/ vagy pedig 0.5 % SDS tartalmu, 0.15 M Na-acetátban oldottuk fel, és még egyszer alkohollal kicsaptuk. A megfelelően mosott, 200-400 µg tartalmu nukleinsavat 0.05 M Tris-HCl pH=7.5, 0.002 M MgCl₂-ban oldottuk, majd Worthington RNáz mentes DNázzal II. /10 µg/ml végkoncentrációban/ 4°C-on 10 percig emésztettük. 0.15 M Na-acetát /0.1 % SDS hozzáadása után alkohollal ismét kicsaptuk a nukleinsavakat, majd végezetül a csapadékot az elektroforézis pufferében oldottuk fel.

Nukleinsav kivonás II. Fenol módszer /Ingle and Burns, 1968,

23/

Az apróra vágott leveleket tízszeres /g/ml/ arányban homogenizáltuk 0.01 M Tris-HCl, pH=7.6, 1 % TNS, 6 % PAS, 0.05 M NaCl, 0.005 M MgCl₂ oldattal VirTis, illetőleg Potter homogenizátorban. A kivonó pufferrel azonos térfogatu fenol-krezol elegyet /80 % fenol, 10 % m-krezol, 0.1 % 8-hidroxiquinolin/ adtunk a szuszpenzióhoz, s szobahőmérsékleten 10 percig erőteljesen ráztuk. 5000 g-vel, 10 percig centrifugáltuk és a vizes fázist leszívtuk. A fenolozást még kétszer megismételtük. A végső fázishoz 0.5 térfogat 0.3 M Na-acetátot és 2.5-szeres 96 %-os alkoholt adtunk. A továbbiakban mindent az előző módszernél leírtak szerint végeztünk.

Kloroplaszt RNS izolálása /Leaver and Ingle, 1971 - 32/

A levélszövetet négyszeres térfogatu jéghideg oldattal /0.33 M sorbit, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM NaCl, 2 mM Na-aszorbát, 50 mM HEPES pH=6.5/ VirTis-ban rövid ideig, 5-10 sec, homogenizáltunk. A kivonatot gézen történő szűrés után centrifugáltuk. /4000 g, 90 mp/. A kloroplasztokból és sejtmagokból álló csapadékot 0.33 M sorbit, 1 mM DTT, 50 mM HEPES, 10 mM $MgCl_2$ pH=7.8 pufferrel egyszer átmostuk, majd 2 % Triton X-100-t tartalmazó 30 mM KCl, 0.01 M Tris-HCl pH=7.4, 0.01 M $MgCl_2$ pufferben nagyon óvatosan szuszpendáltuk, Triton X-100 jelenlétében a kloroplaszt membránok szétestek, míg a sejtmag membránja ép maradt. A sejtmagoktól és egyéb törmelékektől centrifugálással tisztítottuk meg a kloroplaszt lizátumot /25 000 g, 10 perc/. A kloroplaszt kivonatot összekevertük kétszeres detergens koncentrációju, azonos térfogatu kivonó pufferrel, és a nukleinsav kivonást a DEP-módszernél leirtak szerint folytattuk.

Sejtalkotórészek elválasztása /Leaver and Key, 1970, - 31/.

10 g levelet VirTis-ben homogenizáltunk /5 mp, max. fordulat/ 30 ml kivonó pufferben /0.4 M szaharóz, 0.1 M Tris-HCl, pH=7.5, 0.05 M KCl, 0.005 M $MgCl_2$ /. Gézen átszűrtük, majd Triton X-100-at adtunk a szűrlethez úgy, hogy a végkoncentrációja 1 % legyen. /A Triton X-100-t a követke-

zõ pufferben higitottuk: 0.01 M Tris-HCl, pH=7.5, 0.05 M KCl, 0.005 M MgCl₂/. A homogenátumot centrifugáltuk /15 000 g, 15 perc/, s a csapadékot használtuk mag frakcióként, a felüluszt pedig Spinco 50.1 rotorban centrifugáltuk, /40 000 rpm, 80 000g, 2 óra/. A csapadékot szuszpendáltuk 0.01 M Tris-HCl, pH=7.5, 0.002 M MgCl₂ pufferben, majd egy rövid idejű, alacsony fordulatszámú centrifugálás után 1.4 ml kivonatot 20 ml 1 M szaharóz /0.001 M Tris-HCl, pH=7.5, 0.05 M KCl, 0.005 M MgCl₂-ban oldott/ tetejére rétegeztünk. A riboszómákat 3 órás, 80 000 g-s centrifugálással ülepitettük /Spinco 50.1 rotor, 40 000 rpm/.

A nyers mag és a riboszóma frakcióból egyaránt az I. módszer szerint vontuk ki a nukleinsavakat.

Izotóp jelölés

A levágott leveleket levélnyelükkel 0.5-1 ml ³²P vagy ³H-uracil izotóp oldatba állítottuk /0.1 mCi/levél/, miközben a felszívódást ventilációval segítettük elő. 30-45 perc múlva desztillált vizet öntöttünk az edénykébe, s különböző ideig folytattuk az inkubálást.

A ³²P hordozómentes volt, a ³H-uracil specifikus aktivitása: 4.43 Ci/mmol volt. Szükség esetén a KH₂P³²O₄ oldat pH-ját Tris-oldattal 6-7 közé állítottuk be.

Poliakrilamid gélelektroforézis /Loening, 1967 - 34/.

2.4 % poliakrilamid géleket készítettünk 0.6 cm átmérőjű, 8 cm hosszú plexi csövekben.

A polimerizációs elegy 2.4 % akrilamidot, 0.12 % bis-akrilamidot, s az elektroforézishez használt puffert tartalmazta. Az oldott levegő eltávolítása után NNN'N'-tetrametiléndiamin és 10 %-os ammoniumperszulfát /0.0033 ml, illetőleg 0.33 ml/g jelenlévő akrilamid/ hozzáadásával indítottuk a polimerizációt.

Az elektroforézishez a következő puffereket használtuk:

a/ EDTA-SDS puffer: 36 mM Tris, 30 mM NaH_2PO_4 , 1mM EDTA- Na_2
pH = 7.8,

b/ Mg-puffer: 36 mM Tris, 30 mM NaH_2PO_4 , 10mM MgCl_2
pH = 7.8,

c/ alacsony só koncentrációju puffer:

30 mM Tris, 16 mM HCl, 0.1 mM EDTA,
pH = 8.1.

Amennyiben külön nem jelezzük, az Mg-puffert használtuk. Az EDTA-SDS pufferhez futáskor 0.2 %, az alacsony sókoncentrációju pufferhez 0.1 % végkoncentrációban SDS-t adtunk, és az elektroforézist ilyenkor szobahőmérsékleten végeztük. A másik két puffer jelenlétében 4°C-on történt az elektroforézis.

Félóra előfuttatás után az 40 µg nukleinsav tartalmu mintát 10-50 µl-ben, 0.5 % RNáz mentes szaharóz jelenlétében rétegeztük a gélekre. Az elektroforézist 3 óra hosszat

6 mA/cső áramerősség mellett végeztük. A géleken a nukleinsavakat 265 m μ -nál történő fényabszorpció alapján Joyce-Loebl Chromoscan-en lokalizáltuk. Radioaktív minták esetén, a két tus-szurással megjelölt gélt szárazjégben az eredeti hosszának megfelelően megfagyasztottuk, és Nickle gélseletemlőn 1 mm-enként felvágtuk. ^{32}P jelöléskor a szelvényeket közvetlen, szűrőpapír korongokra szárítottuk, és toluolos szcintillátor-eleegyben /5 g PPO, 0.3 g POPOP 1000 ml toluolban/ határoztuk meg a beütések számát. A ^3H -jelzett gélseletemeket 0.5 ml 33 %-os H_2O_2 -ban egy éjszakán át 65°C-on roncsoltuk, majd 100 μl mintákat 5 ml Bray oldatba pipettáztunk /20 ml etilén-glikol-, 100 ml metanol, 3 g PPO, 0.2 g POPOP, 60 g naftalin, 880 ml dioxán/. Packard Tri-Carb szcintillációs spektrofotométeren mértük a radioaktivitást.

III.

A KISÉRLETEK LEIRÁSA

A. Nukleázok Jellemzése

1. Avena nukleázok

A zab két fő ribonukleázának az elválasztása, sajátosságainak a megállapítása lehetővé tette, hogy a két enzim egyidejű vizsgálatával pontosabban megismerhessük a különböző körülmények között kialakuló ribonukleáz szint emelkedését.

a/ A két enzim aránykülönböző koru levelekben

A fiatal levelek nyers kivonatában mérhető RNáz aktivitásnak kb. 80 %-át az RNáz-I. alkotja, az idősebb levelekben viszont felhalmozódik a nukleáz-I. A különböző koru levelekből készült kivonat Sephadex G-75 oszlopon végzett kromatográfiája alapján a két enzim mennyiségét, és arányát tünteti fel a következő táblázat:

	Nukleáz mennyisége $\Sigma \Delta A_{260}$ /ml reakcióelegy		
	Nukleáz I.	RNáz I.	RNáz I./nukleáz I.
6 napos	740	4980	6.7
14 napos	1200	4680	3.9
21 napos	2040	2880	1.4

Az eredmények tükrözik, hogy a levél korának az előrehaladtával valóban, fokozatosan nő a nukleáz-I. szintje, ami az idős levelekben az RNáz-I.-gyel azonos szintet érhet el.

b/ A két enzim arányaa levelek mesterséges öregíté-
sekor

Mint hogy a nukleáz-I mennyisége az öregedés során nő meg, a fiatal levelek sértésekor ellenben az RNáz-I. szintje emelkedik meg, összehasonlítottuk a két enzim arányát 10 napos levél mesterséges öregítésekor /a levágott leveleket nedves szűrőpapíron tartottuk, Petri-csészében/.

Levágás után eltelt idő	Nukleáz mennyisége $\Sigma \Delta A_{260}$ /ml reakcióelegy		RNáz I./Nukleáz I.
	Nukleáz I.	RNáz I.	
0 óra	920	4590	5.0
8 óra	990	9850	9.8
96 óra	2680	13200	4.9

E kísérlet megvilágította, hogy a levelek levágása után két folyamat különíthető el. Először a sértés miatt létrejövő változások az uralkodóak /1. RNáz-I. növekedése/, és az ilyenkor mérhető nagyfokú nukleáz aktivitás nem a meggyorsult öregedésnek a következménye /mint azt korábban gondolták/. Később kerülnek csak előtérbe az öregedés jelenségei, amit tükröz a 96 óra utáni nukleáz-I. szint.

c/ A növényi hormonok hatása a két enzimre

A zab két fő nukleáza valóban eltérő szerephez juthat különböző fiziológiai folyamatokban /1. öregedés, szövetsérülés/, ezért a továbbiakban megvizsgáltuk miként hatnak egyes növekedési hormonok a levágott levélben ezekre az enzimekre.

Benzimidazol, kinetin és abszcizin sav kezelés után néztük az egyes nukleázok mennyiségét. A levágott leveleket megfelelő koncentrációju hormon oldat felületén usztattuk különböző ideig, míg a kontrollt desztillált víz felületére tettük.

A benzimidazol és a kinetin esetében előbb a nyers kivonatban mérhető nukleáz aktivitás meghatározásával mértük e hormonok hatásának idő és koncentráció függését.

0.01 mM - 0.5 mM benzimidazol és 0.02 mM - 0.1 mM kinetin azonos mértékben hatott, mégpedig oly módon, hogy a kinetin csökkentette, a benzimidazol ellenben a kontrolhoz képest fokozta a nukleáz szintet. A kezelés idejének a függvényében a kinetin hatásának a tendenciája nem változott, míg a benzimidazol hosszú idejű inkubálás során /24 óra/ ellenkezőleg befolyásolta a nukleáz szintet, mint a rövid idejű kezelés során /6 óráig/, azaz a kinetinhez hasonlóan, de kisebb mértékben csökkentette a nukleáz szintet. A három hormon hatását az egyes nukleázokra a III. táblázat mutatja.

III. Táblázat

	Nukleáz mennyisége a kontrol /-/ és a hormon- kezelt /+/ levelekben									Nukleáz mennyisége a 0 - idős kontrolban
	Kinetin			Abszscizinsav			Benzimidazol			
	0.05 mM			0.005 mM			0.5 mM			
	-	+	+/-	-	+	+/-	-	+	+/-	
Ribonukleáz	16.8	9.0	0.53	12.6	24.6	1.95	14.4	25.2	1.75	7.1
Nukleáz I.	5.7	5.5	0.96	8.8	9.4	1.06	6.0	6.6	1.15	5.8
Alkalikus foszfodieszteráz	0.5	0.5	1.00	0.9	0.8	0.89	0.6	0.6	1.00	0.7

Három hetes zab növények primer levelét levágás után Petri-csészében desztillált viz /-/ illetőleg hormon oldat /+/ felületén három óra hosszat inkubáltuk, majd a nukleázokat a Módszerekben leírtak szerint kivontuk, elválasztottuk.

A nukleáz mennyiséget $\Sigma \Delta A_{260}$ és $\Sigma \Delta A_{400}$ /foszfodieszteráz/ értékkel fejeztük ki.

A 0-idős kontrol az inkubálás kezdete előtt meghatározott nukleázt jelenti.

A levágott levelek esetében tehát, a rövid idejű hormonkezelés a következő módon befolyásolta az egyes nukleázoknak a szintjét.

- a nukleáz I.-re lényegében egyik hormon sem hatott,
- a benzimidazol és az abszcizin sav a ribonukleáz I. szintjét egyaránt növelte.
- a kinetinnel kezelt levelek, a kontrolhoz képest alacsonyabb aktivitást mutattak.

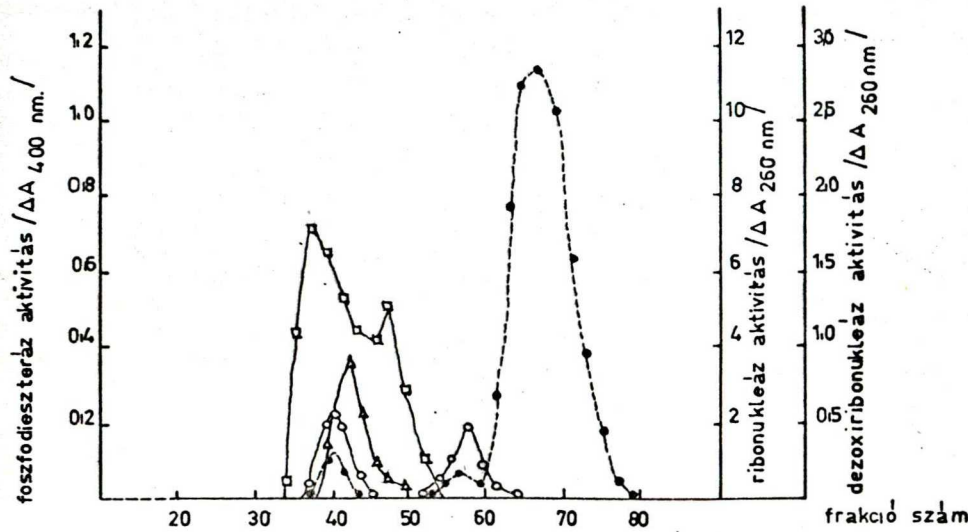
2. A dohány nukleázai egészséges és DMV-sal fertőzött levelekben

a/ Foszfátészter kötést hasító enzimek a dohánylevélben.

A zab levélhez hasonlóan homogenizáltuk a dohány leveleket. A dohányban nagy mennyiségben jelenlévő polifenolok eltávolítása végett dializáltuk a kivonatot, majd ammóniumszulfát telítés után Sephadex G-75 oszlopra vittük a fehérjéket. A kromatográfia eredménye látható a 3. ábrán. A foszfát-észter kötést hasító enzimek a zab-levélhez hasonló eloszlást mutatnak a következő kis eltéréssel:

- nem tartalmazzák a zabban kimutatott két minor ribonukleázt,
- a dohányban található egy nukleáz, amit a zabban nem lehetett kimutatni /35-45 frakció/.

A nyers kivonat ribonukleáz aktivitásának a 80 %-a ebben



3. ábra: A dohány levél foszfát-észter kötést hasító enzimjeinek kromatográfiája Sephadex G-75 oszlopon.

Teljesen kifejlődött Xanthi dohány leveleket /20 g/ háromszoros /g/ml/ mennyiségű 0.05 M Tris-HCl pH=7.5 pufferrel eldörzsöltük. A kivonatot éjszakán át dializáltuk 0.01 M Tris-HCl, pH=7.5 pufferrel szemben. A fehérjéket ammóniumszulfáttal 80 %-os telítés mellett kicsaptuk, 5 ml 0.01 M Tris-HCl pH=7.5 pufferben feloldottuk, majd 2.2 x 100 cm Sephadex G-75 oszlopra rétegeztük, 0.01 M Tris-HCl pH=7.5 pufferrel eluáltuk, és a frakciók enzimaktivitását meghatároztuk.

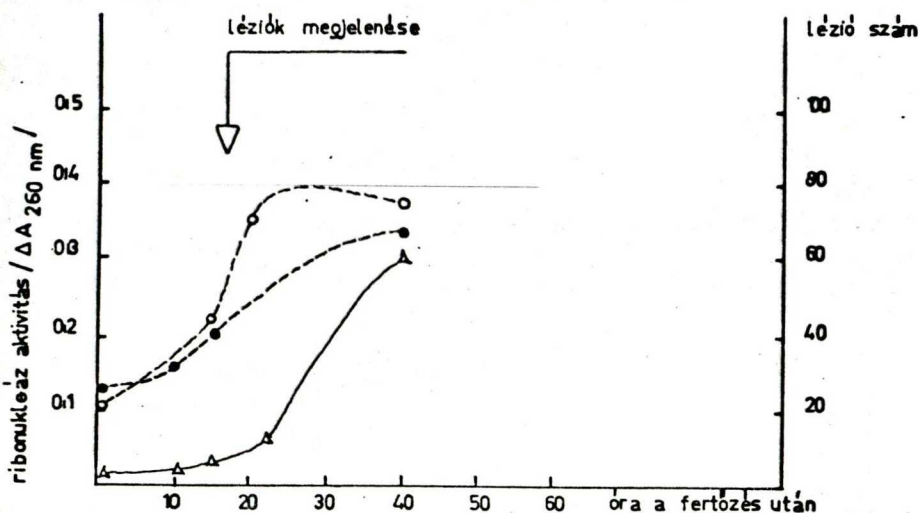
- RNáz aktivitás $\Delta A_{260} / \text{ml}$ - per 30 perc.
- DNáz aktivitás $\Delta A_{260} / \text{ml}$ - per 30 perc.
- △---△ foszfátáz akt. $\Delta A_{400} / 0.1 \text{ ml}$ - per 20 perc.
- foszfodieszteráz akt. $\Delta A_{400} / 0.1 \text{ ml}$ - per 20 perc.

az esetben is az RNáz-I.-re vezethető vissza /mint a fiatal zab levelekben/, az öregedő levelekben viszont kisebb mértékű a nukleáz-I. felhalmozódása, mint az idős zab levelekben.

b/ Nukleáz szint a fertőzött levelekben

A fertőzés okozta nukleáz változás vizsgálatát az érett egészséges és DMV-fertőzött Xanthi nc. levelekből készített nyers kivonat nukleáz aktivitásának az összevetésével kezdtük.

A vizsgált leveleknek az egyik felét inokuláltuk, a másikat pedig celites szuszpenzióval kezeltük. A két levélfélből az inokulálást követően különböző időben mintákat vettünk, és meghatároztuk ezek nukleáz aktivitását /RNáz, DNáz/, valamint lokál-léziós assay-vel a vírus tartalmát. Az eredményeket a 4. ábra tünteti fel az inokulálás után eltelt idő függvényében /A DNáz aktivitás nem változott/. Látható, hogy a fertőzés utáni első időszakban /a léziók megjelenéséig/ mind a kétféle mintában egyaránt nőtt az RNáz aktivitás, majd a következő periódusban /a fertőzés utáni 15-20 óra között/ a fertőzött levél fokozott RNáz aktivitást mutatott. Ez az emelkedés azonban 20 óra tájékan leállt, és a jelentős virusszaporodás ellenére sem változott, s így 40 órára a közben fokozatosan emelkedő kontrollal azonos értéket mutatott.



4. ábra: A dohány-mozaik-vírus fertőzés hatása Xanthi levelek ribonukleáz aktivitására.

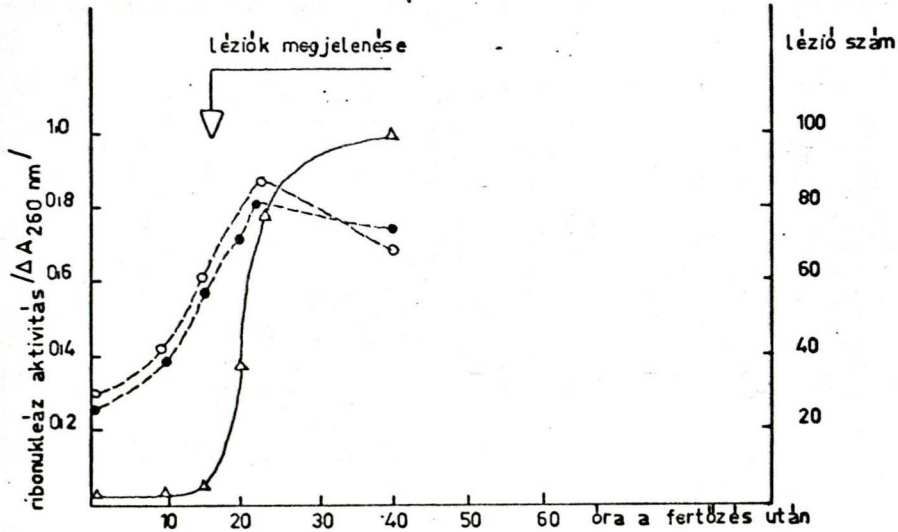
Ép növény fél levelét vírussal inokuláltuk, a levél másik felét pufferes Celite-tel bedörzsöltük. Különböző időtartam után 1.5 cm átmérőjű korongokat vágunk ki, a fertőzött és kontrol részből egyaránt, és 10 korongot 0.05 M Tris-HCl pH=7.5 pufferrel /5 ml/ előörzsöltük. /A kivonás előtt a levél felületét 2 %-os NaOH-oldattal lemostuk, hogy a felületre tapadt vírus részecskéket eltávolítsuk/. A levél-kivonatok RNáz aktivitását és vírus tartalmát határoztuk meg.

- △——△——△ 0.1 ml kivonatban lévő vírus okozta léziószám,
 - RNáz aktivitás az egészséges levél-kivonatban,
 - RNáz aktivitás a fertőzött levél-kivonatban,
- /Δ A₂₆₀/0.1 ml kivonat per 30 perc/

Még kifejezettebbnek látszott, hogy nincs közvetlen összefüggés a vírus szaporodás és az RNáz aktivitás emelkedés között, ha a kísérleteket kivágott levélkorongokon végeztük /5. ábra/.

Ebben az esetben az RNáz aktivitás-emelkedés sokkal kifejezettebb volt, azonban mind a kétféle korongban azonos mértéket mutatott. Ugy látszik, hogy a levágás, plusz a celites bedörzsölés kimerítette a sejtek ribonukleáz szintetizáló kapacitását. Néhány kísérletben a fertőzött korongban egy kicsit magasabb aktivitást találtunk, azonban a görbe lefutása ilyenkor is teljesen azonos volt a kontroléval.

A fertőzött és egészséges levél-kivonat nukleázainak Sephadex G-75 kromatográfiás elválasztása arra utal, hogy a megfigyelt aktivitás emelkedést nem egy új nukleáznak a megjelenése, hanem a ribonukleáz-I. szintjének a megnövekedése okozta.



5. ábra: A dohánymozaik virus fertőzés hatása Xanthi levélkorongok ribonukleáz aktivitására.

Több levélből 1.5 cm átmérőjű korongokat vágunk ki, és azokat inokuláltuk a virussal, a kontrol korongokat pedig pufferes Celit-tel dörzsöltük be. Petri-csészében, nedves szűrőpapíron inkubáltuk a korongokat, és különböző időpontban meghatároztuk 10 korong nukleáz aktivitását és virus tartalmát /a 10 korongot 5 ml 0.05 M Tris-HCl pH=7.5 pufferben homogenizáltuk/.

- △—△— 0.1 ml kivonatban lévő virus okozta léziószám,
●---●---● RNáz aktivitás a kontrol levélkorongokban,
○---○---○ RNáz aktivitás a fertőzött levélkorongokban.
/ ΔA_{260} /0.1 ml kivonat per 30 perc/.

B/ A dohánymozaik vírusfertőzés és a gazda rRNS szintézise

Ahhoz, hogy megtudjuk, miként változtatja meg a DMV fertőzés a gazda rRNS szintézisét, és eldönthessük, hogy elsődleges szerepet játszik-e a rRNS szintézisének gátlása a fertőzés utáni nukleinsav-anyagcsere megváltozásában, először meg kellett néznünk az egészséges levélben történő rRNS szintézist.

1. Az egészséges növény rRNS szintézise

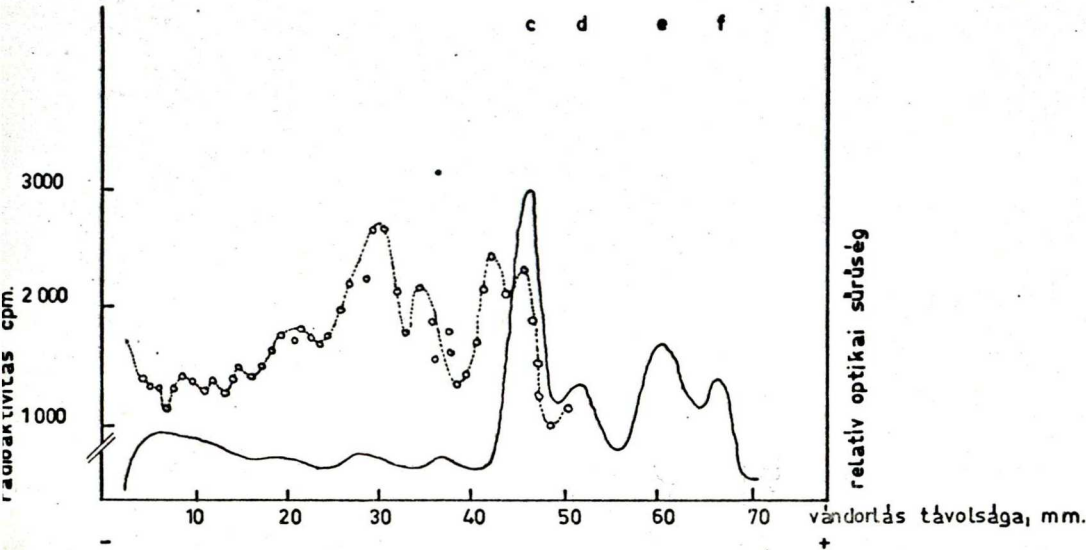
Először meghatároztuk az izotóp jelölés optimális körülményeit. Ép levelek esetén az ilyen jellegű kísérleteknek nagy problémája, hogy nehéz azonos körülményeket biztosítani az izotópnak a sejtekbe való bejutásához, és a nagy, különböző lokalizációjú foszfát és nukleotid pool megléte miatt egzakt kinetikai mérések nem végezhetők. Kísérleteink során, ezért nagy izotóp feleslegbe állítottuk a leveleket, mindig csak az azonos leveleken, egy jelöléskor kapott számértékeket hasonlítottuk össze, és minden kísérletet több alkalommal megismételtünk. 0.1 mCi/levél P^{32} használatakor, a mi körülményeink között, a beépült P^{32} mennyisége legalább 8-12 órán át lineáris volt; a kloroplaszt rRNS-ekbe csak 3 órás inkubálás után lehetett inkorporációt kimutatni. A nukleinsavakra sokkal specifikusabb H^3 uracillal hasonló jelölés eloszlást kaptunk,

igy a kísérletek döntő többségét az egyszerűbben mérhető és olcsóbb P^{32} -vel végeztük.

Pulzus jelölt nukleinsav poliakrilamid gélelektroforitikus elválasztását mutatja a 6. ábra.

Az irodalmi adatoknak megfelelően a jelölt RNS egy része heterogén eloszlást mutat /heterogén nukleáris RNS/, más része a nagy molekulásulyu tartományban két illetőleg 3 csucst alkot, amelyek $2.3 - 2.6 \times 10^6$ d, az 1.4×10^6 d rRNS prekurzoroknak, illetőleg az 1.3×10^6 d néhez citoplazmatikus rRNS-nek felelnek meg /31, 49, 8/. A nagy molekulásulyu prekurzor / $2.3 - 2.6 \times 10^6$ d/ a dohány levélben is valószínűleg két komponensből áll, miékként azt az élesztő, spenót, borsó, répa és juhar sejtek esetében kimutatták /49, 19, 8, 31/. A nagy molekulásulyu prekurzorok mindkét nukleinsav kivonási módszer használatakor azonosak voltak, ami sugallja azok valódi /nem műtermék/ mivoltát, másrészt bizonyítja, hogy a DEP-módszerrel a rRNS-ek gyorsan jelölődő prekurzorai ugyanolyan mértékben kinyerhetők, mint a fenolos elegy használatakor. Ennek a frakciónak a prekurzor természetét részint aktimonicin D jelenlétében végzett chase kísérlettel, részint a jelölésnek a különböző sejtfrakcióban való megoszlásával néztük.

A chase kísérletben, az inkubálás során a nagy molekulásulyu régióban csökkent a beütés, míg ezzel egyidejűleg az érett rRNA-ban nőtt a radioaktivitás.



6. ábra: A dohány levél gyorsan jelölődő ribonukleinsavainak gélelektroforetogramja.

4 közepes nagyságu levelet jelöltünk 0.4 mCi P^{32} foszfáttal egy óráig. A nukleinsavakat fenol módszerrel vontuk ki, DNáz emésztettük és poliakrilamid gélen futtattuk. A poliakrilamid gélelektroforézist alacsony só koncentrációju pufferben 6 óra hosszat, 3.2 mA/cső áramerősséggel végeztük.

————— rádióaktivitás,

----- relatív optikai sűrűség,

c - citoplazmatikus nehéz rRNS,

d - kloroplaszt nehéz rRNS,

e - citoplazmatikus könnyű rRNS,

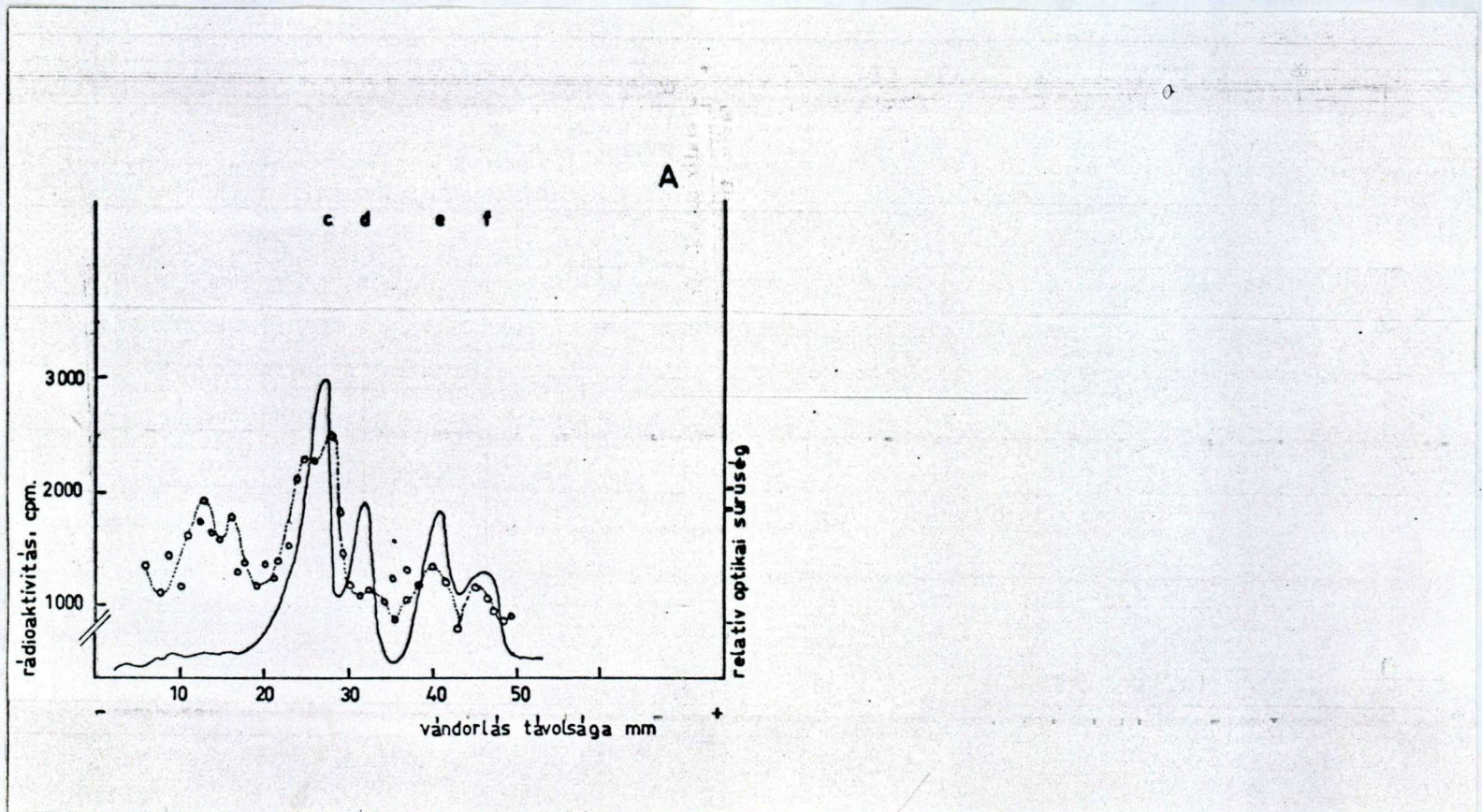
f - kloroplaszt könnyű rRNS.

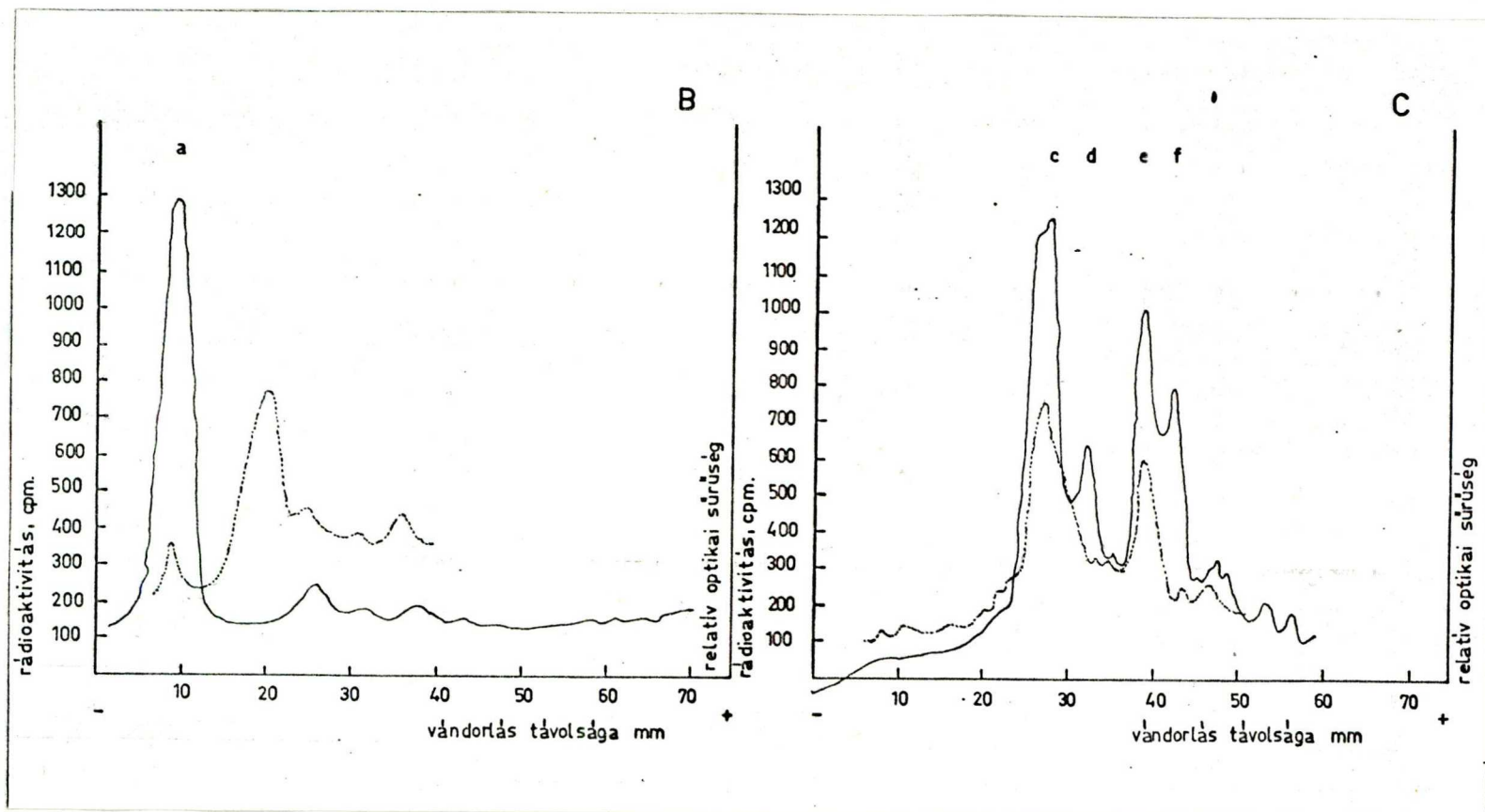
Tökéletes chase-t nem lehetett végezni a prekursor pool nagysága és a nem 100 %-os aktinomycin D gátlás miatt.

A sejtkomponensek elválasztása /7. ábra/ során a nagy molekulásulyu, pulse kísérletekben jelölődő RNS-t csak a megfrakcióban találtuk, és a felüluszóban csak a rRNS-ekben mértünk beütést. Ez összhangban áll Leaver és Key /31/ eredményével, akik kimutatták, hogy a 2.3 ill. 2.6×10^6 d, az 1.4×10^6 d és 0.9×10^6 d prekursorok a megban szintetizálódnak és a citoplazmába már csak a nukleolitikus hasítás, metilezés során kialakult érett rRNS-ek kerülnek. A rRNS prekursorok további jellemzését, azonosítását nem végeztük el /bázis analízis, hibridizáció, metil H^3 -donorral való jelölés/, mivel azokat csak abban az esetben tartottuk indokoltnak, amennyiben a vírus fertőzés során sikerül lényeges rRNS szintézis gátlást kimutatnunk.

2. A fertőzött növény rRNS szintézise

Kísérleteink idején a növényeinket nem tudtuk azonos, ellenőrzött körülmények között nevelni. A fertőzési ciklus időbeni lefolyását nagy mértékben befolyásolják a külső időjárási tényezők, ezért kísérleteink összehasonlítási alapjául a különböző szimptomáknak a megjelenését tekintettük, mivel ezek a vírus szaporodásának a meghatározott fázisát jelentették.





7. ábra: Dohány levél pulzus jelölésekor a radioaktivitás az össz-
-nukleinsav kivonatban /A/, a mag /B/ és a riboszómális
frakcióban /C/

6 levelet /kb. 11 g/ 0.6 mCi P^{32} foszfáttal egy óra hosszat jelöltünk,
majd 10 g-ból a Módszerekben leírtak szerint elválasztottuk a mag és
a riboszómális frakciókat, 1 g-ból pedig közvetlenül kivontuk a nuk-
leinsavakat DEP módszerrel.

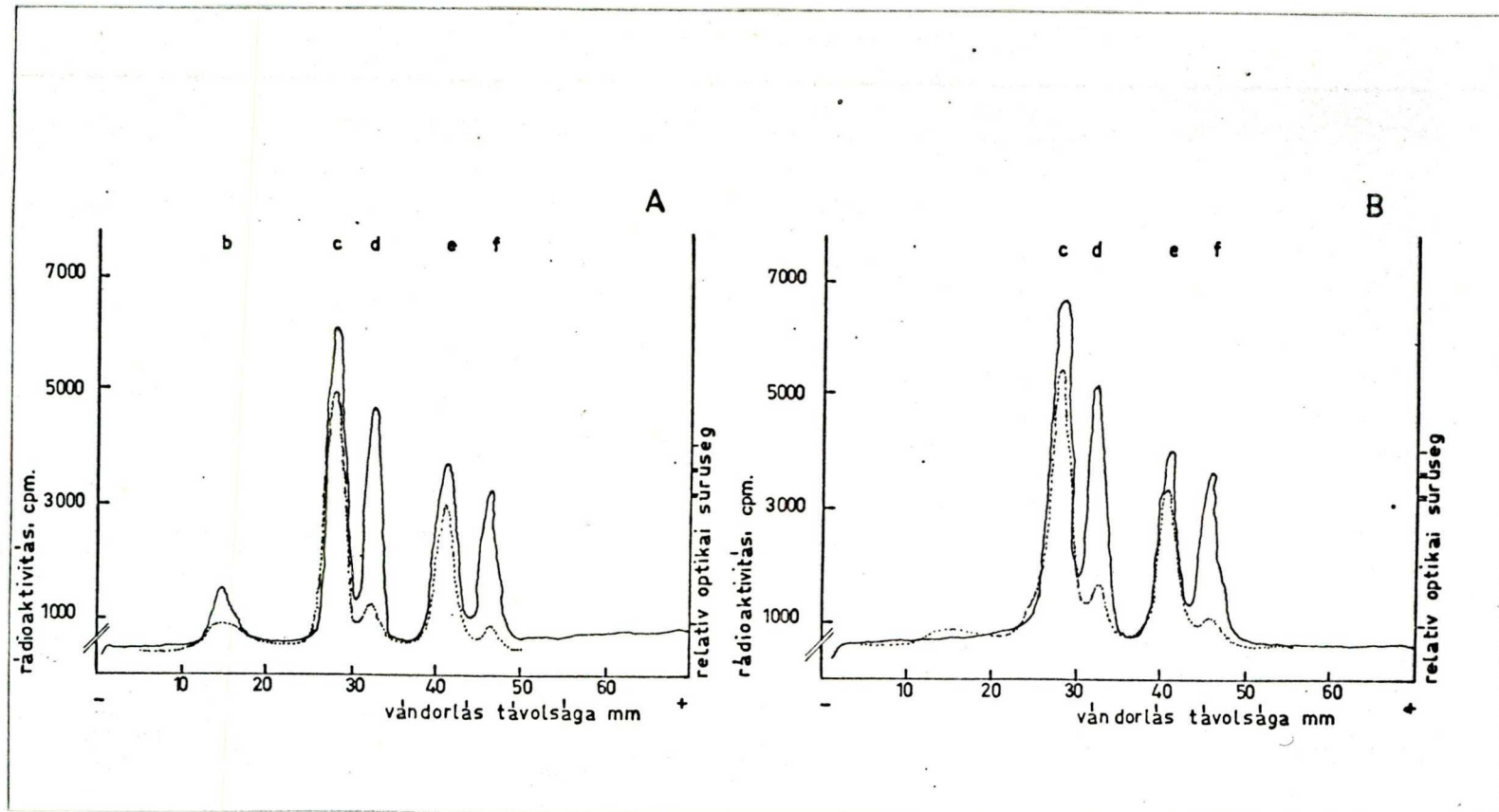
- a - DNS
- c - citoplazmatikus nehéz rRNS 1.3×10^6 d
- d - kloroplaszt nehéz rRNS 1.1×10^6 d
- e - citoplazmatikus könnyű rRNS 0.7×10^6 d
- f - kloroplaszt könnyű rRNS 0.56×10^6 d

————— radioaktivitás
----- rel.optikai sűrűség

A "vein clearing"-et mutató levelekre jellemző, hogy ebben a rendszerben valósul meg leginkább a levélsejtek szinkron fertőződése, és ebben az esetben a legnagyobb mértékű a vírus felszaporodása. A tünetek az intenzív vírus szaporodás /exponenciális szakasz/ befejeződése után legkésőbb 24 órán belül megjelennek, így ezek a levelek a "korai" változásokat tükrözik.

A mozaikos szimptoma az inokulálást követően sokkal később fejlődik ki /10-12 nap/, és mivel a kísérleteinkhez 10-12 cm-es leveleket használtunk, /amelyekben már lelassult a vírus szintézise/ ezek a fertőzés következtében kialakuló késői változások jellemzőinek tanulmányozására voltak alkalmasak.

A különféle szimptomájú levelek rRNS szintézisét rövid és hosszú jelölés során összehasonlítottuk az egészséges kontroléval. Minden egyes tünetnél legalább 20 esetben elvégeztük mind a kétféle jelölést független kísérletekben, és egyik esetben sem sikerült lényeges eltérést kimutatnunk a fertőzött és az egészséges levél között. Jellemzőképpen bemutatjuk a mozaikos levéllel végzett 6 órás jelölés eredményét /8. ábra/. Mivel ez az eredmény ellentmondott a meglevő irodalmi adatoknak a következő ellenőrző kísérleteket végeztük el, az esetleges módszertani hibák kiküszöbölése végett.



8. ábra: Mozaikos tüneteket mutató fertőzött levél /A/, és a megfelelő egészséges levél /B/ nukleinsavainak a gélelektroforetikus elválasztása.

A leveleket 6 óra hosszat jelöltük 0.1 mCi/levél P^{32} foszfáttal, a nukleinsavakat fenol módszerrel kivontuk, DNáz emésztettük, és poliakrilamid gélen elválasztottuk.

———— radioaktivitás,
 - - - - - optikai sűrűség /relatív/.

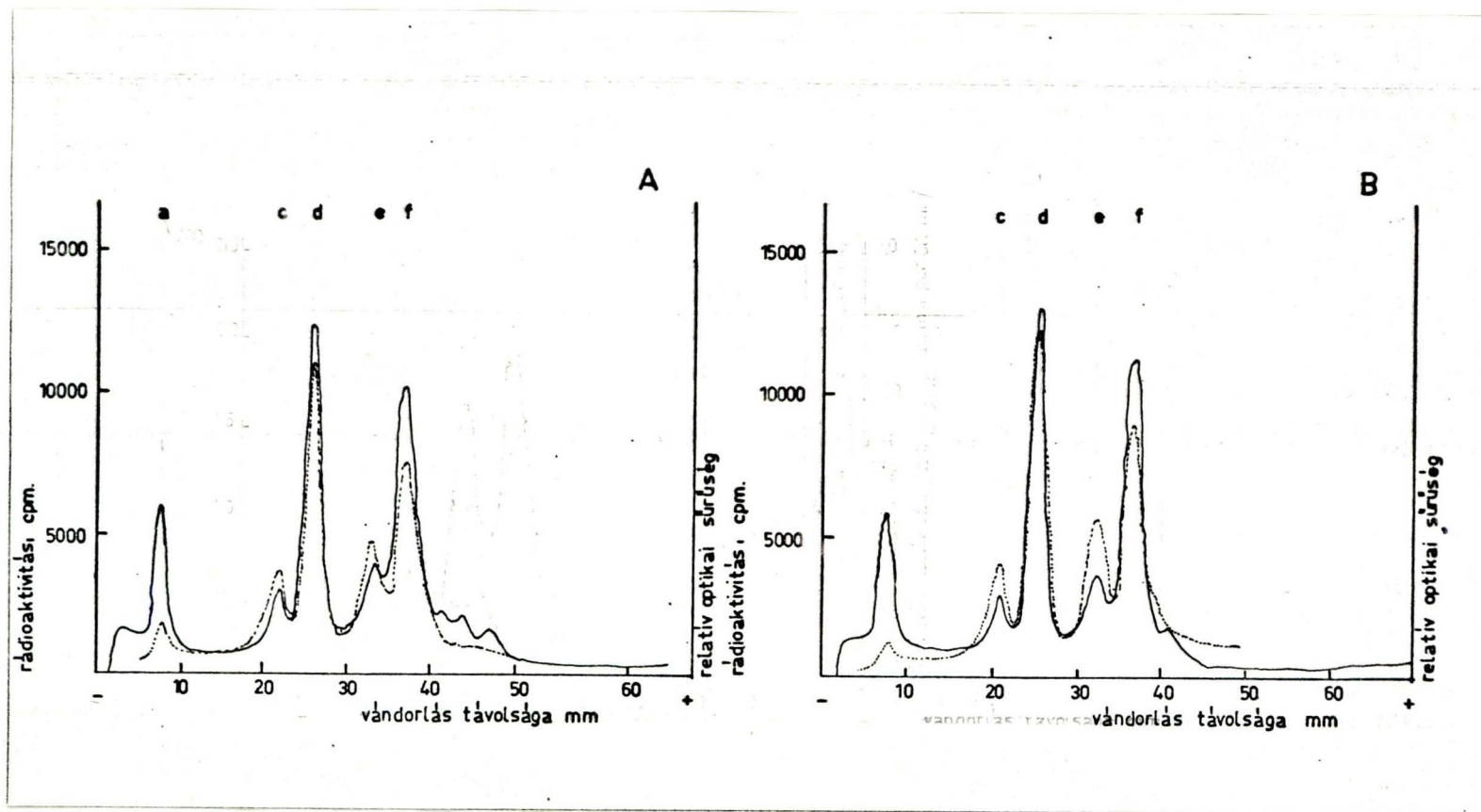
b - DMV-RNS
 c - citoplazmatikus nehéz rRNS
 d - kloroplaszt nehéz rRNS
 e - citoplazmatikus könnyű rRNS
 El- kloroplaszt könnyű rRNS

- a./ Kétféle nukleinsav kivonási módszert használtunk, és mindkét esetben azonos eredményeket kaptunk. A DEP-módszernek ezuttal két előnyét akartuk kihasználni. Egyrészt a fenol módszerrel szemben lehetőséget nyújt sokkal kevésbé degradált nukleinsavaknak a kivonására, másrészt lehetővé teszi a gazda nukleinsavainak a preferenciális elemzését a fertőzött növényekben. Bagi és mts. ugyanis kimutatták, hogy a DMV-fertőzött levelekből a gazda rRNS-ei selektíve kinyerhetők a vírus RNS kivonása nélkül /4/.
- b./ Fräser a fertőzött levelekben nemcsak a kloroplaszt rRNS-ek szintézisének a leállítását, hanem a fokozottabb degradációját is megfigyelte, ezért megnéztük, vajon nem játszik-e lényeges szerepet a csökkent szintézis kimutatásakor az a tényező, hogy a lebontásra fokozottabban hajlamos kloroplaszt rRNS-ek a kivonás és az elemzés során lebomlanak. Leaver és Ingle /31/ kimutatták, hogy kétértékű kationok távollétében az 1.1×10^6 d kloroplaszt rRNS lebomlik, ezért a fertőzött és egészséges növények nukleinsavainak az elemzését elvégeztük Mg^{++} ion távollétében is. Tehát olyankor is összehasonlítottuk azt egészséges és a fertőzött levelek nukleinsavait, amikor sem a kivonó, sem az elektroforézis puffer nem tartalmazott kétértékű kationt, illetőleg Mg jelenlétében vontunk ki, de SDS-EDTA rendszerben választottuk el az egyes nuklein-

sav komponenseket. Egyik féle kísérletben sem tudtuk a fertőzött levelek kloroplaszt rRNS-einek a preferenciális degradációját észlelni.

c./ Az esetleges változás jobb kimutatása érdekében az izolált kloroplasztokból nyert nukleinsavak gélelektroforézisét is elvégeztük, hogy kiküszöböljük a citoplazmatikus rRNS-eknek az esetleges zavaró hatását a gélelektroforézis értékelésekor. Ez látható a 9. ábrán.

Ezuttal sem találtunk különbséget a fertőzött és a kontrol növények között.



9. ábra: "Vein clearing" tüneteket mutató fertőzött /A/ és egészséges levélből /B/ izolált kloroplasztokból kivont nukleinsavak gélelektroforetikus képe.

A leveleket ^{32}P -foszfáttal jelöltük 14 óra hosszat. A kloroplaszt izolálást, nukleinsav kivonást a Módszerek-ben leírtak szerint végeztük.

————— rádióaktivitás,
 - - - - - relatív optikai sűrűség.

III.

KÖVETKEZTETÉSEK

A.

1. A zab levél nukleázainak vizsgálata a kísérletek ezen fázisában az alábbi megállapításokra vezettek:

a/ Idős levelekben a korábban minornak vélt ribonukleáz aktivitás az RNáz-I.-gyel azonos szintet érhet el.

Az aktivitásért felelős enzim, a nukleáz-I. sajátosságaiiban lényegesen különbözik a fiatal levelek fő ribonukleázától, /szubsztrát specificitás, pH optimum, ion-érzékenység, lokalizáció/ és attól jól elkülöníthető molekulasulya és enzimaktivitása alapján.

Mások /6/ nehéz vízzel történt jelölés alapján bebizonyították, hogy az öregedésre specifikus nukleáz aktivitás-emelkedés de novo enzimszintézis eredménye.

b/ A zab levél öregedésre specifikus nukleáza, a nukleáz-I. valószínűleg egységes enzim. A tisztított fehérje /130 x/ ugyan ribonukleáz, dezoxiribonukleáz és 3'nukleotidáz aktivitást egyaránt mutat, feltehetően mindezek az aktivitások egy enzimnek a sajátosságai, amire a következők utalnak:

- a tisztítás során /gélszűrés, ioncserélő kromatográfia/ a háromféle enzimaktivitás mindig pontosan azonosan viselkedett
- hormon-kezelésre egyformán változtak

- ionok iránti érzékenységük is azonos volt, az egyetlen Zn^{++} ion kivételével
 - a ribonukleáz és dezoxiribonukleáz aktivitás bázis specificitása megegyezik.
 - sejtfractionálás során mindegyik aktivitás egyaránt 100 000 g-nél ülepszítható partikulumhoz kötött volt,
 - a zab nukleáz-I.-gyel teljesen azonos tulajdonságu enzimet izoláltak szója babból /27, 28/ és buza magból /29, 30/, és mindkét esetben kapcsolatosan találták a ribonukleáz, dezoxiribonukleáz és 3'nukleotidáz aktivitást. Főleg buza mag enzim homogenitását vizsgálták igen körültekintően, és mind az ultracentrifugálás, mind az SDS-poliaktilamid gélelektroforézis egyetlen polipeptid lánc jelenlétére utalt.
- c/ A két enzim elkülönítése lehetővé tette, hogy a levágott levélben végbemenő változások természetét jobban megismerjük. Így megtudtuk, hogy a levágást követően először a sértésre reagáló ribonukleáz-I. szintje nő meg ugrásszerűen, és csak később, mintegy 4 nap múlva kerül előtérbe az öregedés specifikus nukleáz-I. szintjének a megnövekedése. Tehát, két részre lehetett bontani azt a folyamatot, amit régebben egyértelműen a levágást követő öregedési folyamatok fokozódásának tulajdonítottak.
- d/ A hormonok hatásának vizsgálata elsősorban a levágott levelek nukleázainak, a hormonok jelenlétében kialakuló szintjét mutatják.
- Igy a sértés következtében létrejövő RNáz-I. szintjének

az emelkedését a kintin gátolta, az abszcizin sav és a benzimidazol ellenben serkentette. Ilyen körülmények között egyik hormon sem befolyásolta a nukleáz-I. szintjét, ami különösen az abszcizin sav esetében meglepő, mivel ez a hormon az egyszikűekben az öregedést gyorsítja, és a nukleáz-I. az öregedés során felhalmozódik. Érdekes még, hogy a benzimidazol és a kintin ez esetben, rövid kezeléskor ellentétes hatást váltott ki, míg in vivo az egyszikűek öregedésekor azonos a hatásuk.

2. A dohány levél nukleázokkal végzett kísérletek eredménye

a/ A kifejlődött dohány levélben a fő foszfát-észter kötést hasító enzimek a fiatal zab levélhez hasonló eloszlást mutatnak. Idősebb levelekben kisebb mértékű a nukleáz-I. felhalmozódása, mint a zabnál.

b/ A dohánymozaik virus "indukálta nukleáz aktivitás".

Ugyan sikerült megismételni a korábban kapott eredményeket, azonban ezek tüzetesebb elemzése arra utal, hogy nehéz okozati összefüggésre következtetni a nukleáz indukció és a virus szaporodása között. A nukleáz aktivitás növekedése ugyanis nem párhuzamos magával a virus szaporodásának a menetével, és a lézió megjelenését követően rövid ideig mutatható csak ki a magasabb enzimszint a fertőzött levelekben. A virusfertőzés valószínű-

leg nem indította el egy új, specifikus nukleáz szintézisét, hanem az emelkedés a ribonukleáz-I. sajátja. Valójában aspecifikus hatásról lehet szólni ami inkább az inokulálás és a léziók okozta sejtkárosodás következménye, mint magának a virusszaporodásának.

Aspecifikus hatásra utal Rendles /47/ eredménye is, aki szisztémikus fertőzéskor, a tünetek kifejlődése után /amikor a vírus szintézis gyors szakasza már lezárult/ az öregedés specifikus nukleáz szint emelkedését találta.

B

A rRNS szintézise dohánymozaik virus fertőzött levelekben

Ezeket a kísérleteket szisztemikus-fertőzött leveleken végeztük, mivel elsősorban a "vein-clearing" megjelenéséhez vezető vírus fertőzéskor lehet legjobban megvalósítani a sejtek szinkron fertőzését.

Többen észlelték ilyen esetekben a riboszómális, főleg a kloroplaszt rRNS-ek szintézisének a megszűnését és fokozott degradációját /1, 2, 14, 15, 16, 21, 40, 45/. Ezeknek az eredményeknek egy része nem megfelelő elemzések alapján alakult - MAK kromatográfia, szaharóz grádiens centrifugálás - /tehát olyan körülmények között, amikor sem a kétféle citoplazmatikus, sem pedig a kloroplasztisz rRNS-ek jó elválását nem lehetett biztosítani /1, 2, 40/, vagy pedig a kontrollból is degradáltan kivont nukleinsavak gélelektroforézise /45/.

Másik részüket ellenben, a mienkhez hasonló körülmények között, azonos módszerekkel végzett kísérletek támasztanak alá /14, 15, 16, 21/.

Ennek az ellentmondásnak a megítélésékor a következőket kell figyelembe venni.

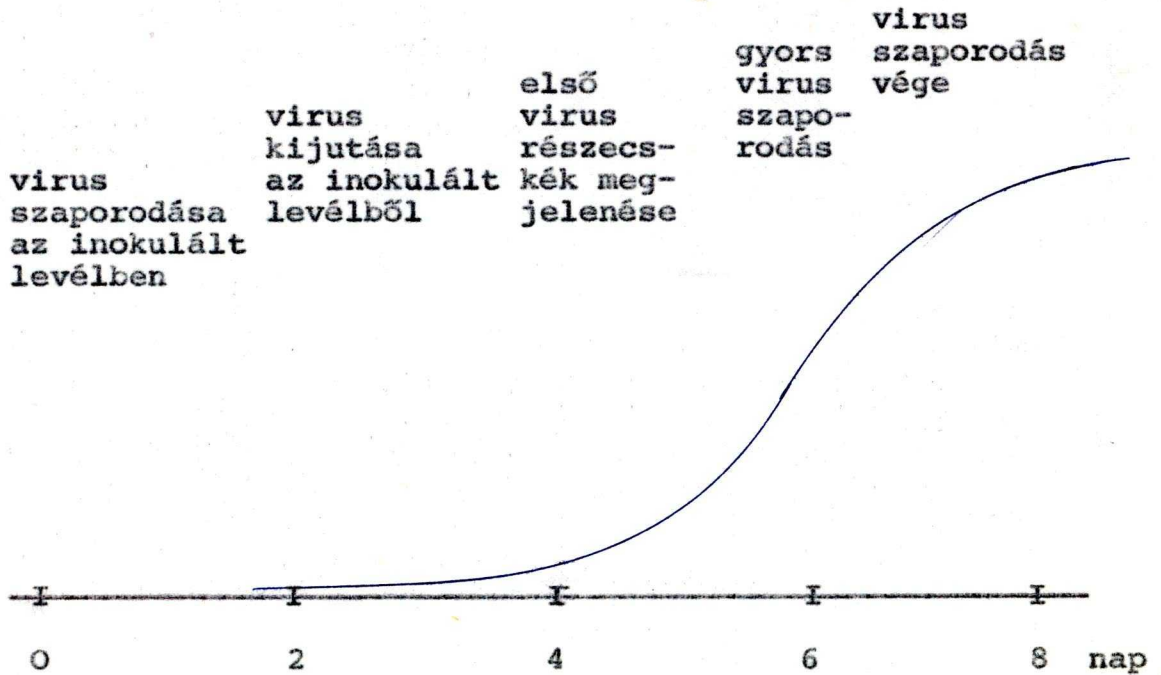
a/ A fertőzés menete nagyon sok külső, nehezen ellenőrizhető tényező függvénye /hőmérséklet, páratartalom, fény, a növény tápanyagellátottsága/. Miután a kísérleteink idején csak hagyományos üvegházban tudtuk nevel-

ni növényeinket, azok növekedése elég nagy mértékben ki volt téve az időjárás szeszélyeinek. Ezért nem is tudtunk szisztematikus elemzést végezni a fertőzési ciklus különböző időpontjában, hanem minden esetben a tünetek megjelenéséhez viszonyítottuk a kísérleteinket. Ez egyik döntő forrása lehet a "negatív eredményeknek", mivel Fräser is az egyik kísérlet sorozatában csak a mozaikos levelekben és a tünet kialakulása után egyetlen időpontban /négy nap múlva/ tudott kimutatni jelentős gátlást /15/.

- b/ A növényi vírusfertőzés egyik különlegessége, hogy nagyon lassu a lefolyása; az RNS bakteriofágok egy órás, az állati RNS vírusok 6-18 órás fertőzési ciklusával szemben 3-10 napig tart /a protoplasztokban is 24-72 óra/ ahol a fertőzés szinkron és egy ciklusos - 57/.

A szisztemikus fertőzés hosszú ideje alatt több folyamatnak kell lezajlania, amit vázlatosan így szemléltethetnénk Nilsson-Tillgren és Oxelfelt adatai alapján /39, 44/, /l. következő oldal/.

Mivel mindegyik lépés függvénye lehet a vírus és a gazda sokféle tulajdonságainak, amíg ezek pontos lefolyását nem ismerjük, nagyon nehéz általános megállapításokat tenni, főképpen egy-egy kiragadt fázist illetően, ahogy mi a kísérleteinket végezni tudtuk.



c/ Minden esetben az előzőekhez hozzáadódó komplikáló faktor, hogy a kísérletek során mindig heterogén sejt-populáció van jelen, aminek két fontos kihatása van. Egyrészt magát a virus szaporodást, annak következményeit, döntően megszabja, hogy a sejtek a fertőzéskor milyen idősök, és a sejtciklus melyik fázisában vannak, másrészt ezzel összefüggésben nagy mértékben különbözhet az egészséges sejtek okozta háttér /amit nem tudunk, hogy adott esetben mekkora/.
Fiatalabb leveleknél a mozaik szimptóma jön létre, amire a fertőzetlen sejtek éles elkülönülése és a kisebb

mértékű vírus hozam jellemző, míg a viszonylag idősebb levelekben "vein-clearing" alakul ki, amelynél sokkal nagyobb mértékű a virusszaporodás.

d/ Nem lehet kizárni annak a lehetőségét, hogy az általunk használt vírus törzs a sokszoros passzálás során módosult és éppen ez a sajátosága változott meg, ami a rRNS-ek degradációjáért felelős. Ez annál is inkább elképzelhető, mert Fräser is lényeges különbséget talált az egyes törzsek viselkedésében; pl. a flavum sokkal drasztikusabb hatást váltott ki, mint a vulgare törzs.

e/ Végezetül, utalnánk D.C. Reanhey közleményére /48/, aki a növényi és állati vírus rendszerek összehasonlításakor érdekes mozzanatokra hívta fel a figyelmet.

A növényi vírusok az állatiakhoz képest sokkal kisebb morfológiai variációkat képeznek, és amíg a növényi vírusok 98 %-ánál egyes szálu RNS a genetikai információ hordozója, addig az állati vírusok közül sokban dupla szálu DNS található.

Valószínű, hogy ezek az eltérések a két gazda szervezet alapvetően más felépítésének a vetületei. Az állati szervezetekben a különféle sejtek, szövetek, szervek működésének a magas szintű koordinációja valósul meg, a növényi szervezet viszont ilyen tekintetben sokkal kezdetlegesebb; teljesen hiányzik belőle a moz-

gás- és idegrendszer, így a külső környezet változá-
saival szemben sokkal tehetetlenebb, és esetleg olyan
változások is létre jöhetnek bennük, amik a sokkal ki-
finomultabb regulációju állatokban letálisak lennének.

A növényi vírusok morfológiai egyszerűsége, szé-
les gazdaspektruma, szabad vándorlása a sejtek között
- szembeállítva a növények kiszolgáltatottságával a
külső környezeti hatások változékonyságának /helyhez-
kötöttség, idegrendszer hiánya/ a sejtek közötti kap-
csolat kezdetlegeséé gével, a gyorsan reagáló geneti-
kai rendszer iránti szükséggel - a növény számára is
igen előnyös kapcsolatoknak a lehetőségét veti fel.
Igy a növényi vírusok olyan eszközt jelenthetnek a nö-
vények számára, amely révén a földrajzilag rögzített
élőlényben előnyös genetikai változások jöhetnek lét-
re, és az egymással ivaros uton nem kereszteződő fa-
jok között kedvező "regulációs információk" kicseré-
lődhetnek. Ez különösen akkor lehet nagy jelentőségű,
ha a jövőben beigazolódik, hogy a magasabb rendű,
eukariota szervezetekben az RNS-ek bizonyos típusainak
jelentős szabályozó funkciója van.

Ilyen megközelítés szellemében érthetőbb, miért sokkal
ritkább a növényi vírusok okozta letális citoplazma-
tikus hatás, /aminek egyik biztos biokémiai jellemző-
je lenne a rRNS szintézis leállása/, és ha a fertőzés

után módosul is a gazda anyagcseréje, ezeknek a változásoknak a természete egészen más sajátságokat vi-
selhet, mint a virulens bakteriofágok és állati viru-
sok indukálta változások a litikus fertőzés során.

Összefoglalva, az általunk vizsgált két alapvető bio-
kémiai folyamatnak, /nukleázok működése, és a rRNS szin-
tézise/, a DMV fertőzés következtében kialakuló változá-
sáról, a következőt mondhatjuk. Míg a fokozott nukleáz
aktivitás valóban kísérője a DMV fertőzésnek, azt való-
színűleg a fertőzéssel, és a lézió kifejlődésével járó
sejtkárosodás váltja ki.

Az rRNS szintézisnek a leállítását nekünk nem sikerült ki-
mutatnunk. Figyelembevéve a kísérleti rendszer sajátságai
által okozott módszertani nehézségeket, amelyek külön-
böző megfigyelések forrásai lehetnek, valamint a növényi
virusok szaporodásának elméletileg várható következmé-
nyeit, arra következtethetünk, hogy a rRNS szintézis gát-
lása nem lehet egyik döntő és korai kiváltója a gazda-
anyagcsere fertőzés utáni módosulásának.

IRODALOMJEGYZÉK

- 1/ Babos, P., Nature, 211 /1966/ 972.
- 2/ Babos, P., Shearer, G.B., Virology, 39 /1969/ 286.
- 3/ Bagi, G., Farkas, G.L., Phytochemistry, 6, /1967/ 161.
- 4/ Bagi, G., Gulyás, A., Solymosy, F., Virology, 42 /1970/ 662.
- 5/ Baltimore, D., Franklin, R.M., Biochim. Biophys. Acta, 76 /1963/ 431.
- 6/ Baumgartner, B., Kende, H., Matile, P., Plant Physiol. 55 /1975/ 734.
- 7/ Bishop, D.H.L., Biochem. J., 97 /1965/ 17.
- 8/ Cecchini, J.P., Miassod, R., Ricard, J., Febs-Letters, 28 /1972/ 183.
- 9/ Darnell, J.F.Jr., Girard, M., Baltimore, D., Summers, D.F., Maizel, J.V.Jr., in: "The Molecular Biology of Viruses", 1967, Acad. Press N.Y. 375.
- 10/ Ellis, D.B., Paranchych, W., J. Comp. Cell Physiol., 67 /1963/ 207.
- 11/ Farkas, G.L., Lovrekovich, L., Phytopathology, 55 /1965/ 519.
- 12/ Fraenkel-Conrat, H., Proc.N.A.R. /1966/ 480.
- 13/ Franklin, R.M., Baltimore, D., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27 /1962/ 175.
- 14/ Fräser, R.S.S., Mol. gen. Genetics, 106 /1969/ 74.
- 15/ Fräser, R.S.S., Virology, 47 /1972/ 261.
- 16/ Fräser, R.S.S., J. Gen. Virol, 18 /1973/ 272.
- 17/ Fräser, R.S.S., Virology, 56 /1973/ 379.

- 18/ Guilley et al., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 72 /1975/ 864.
- 19/ Hartley, M.R., Ellis, R.J., Biochem. J. 134 /1973/ 249.
- 20/ Hirai, A., Wildman, S.G., Virology, 33, /1967/ 467.
- 21/ Hirai, A., Wildman, S.G., Virology 38 /1969/ 74.
- 22/ Hudson, J.B., Paranchych, W., J. Virol, 1 /1967/ 529.
- 23/ Ingle, J., Burns, R.G., Biochem. J. 110 /1968/ 605.
- 24/ Ingle, J., Sinclair, J., Nature, 235 /1972/ 30.
- 25/ Jackson, A.O., Mitchell, D.M., Siegel, A., Virology, 45 /1971/ 182.
- 26/ Jackson, A.O., Zaitlin, M., Siegel, A., Francki, R.I.B., Virology, 48 /1972/ 655.
- 27/ Johnson, P.H., Laskowski, M.Sr., The J. Biol. Chem. 243 /1968/ 3421.
- 28/ Johnson, P.H., Laskowski, M.Sr., The J. Biol. Chem. 245 /1970/ 891.
- 29/ Kroeker, W.D., Fairley, J.L., The J. Biol. Chem. 250, /1975/ 3773.
- 30/ Kroeker, W.D., Fairley, J.L., The J. Biol. Chem. 250, /1975/ 3767.
- 31/ Leaver, C.J., Key, J.L., J.Mol. Biol. 49 /1970/ 671.
- 32/ Leaver, C.J., Ingle, J., Biochem.J. 123 /1971/ 235.
- 33/ Litvak, S., Tarrago, A., Tarrago-Litvak, L., Allende, J., Nature New Biol. 241 /1973/ 88.
- 34/ Loening, E.U., Biochem. J. 102 /1967/ 251.
- 35/ Lovrekovich, L., Klement, Z., Farkas, G.L., Science, 145 /1964/ 165.

- 36/ Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., The J.Biol.Chem. 193 /1951/ 265.
- 37/ McCarthy, D., Landler, D., Howkes, S., Ketteridge, S., J. Gen. Virol. 17 /1972/ 91.
- 38/ McCormick, W., Penman, S., Virology, 31 /1967/ 135.
- 39/ Nilsson-Tillgren, T., Kolehmainen-Sevéns, L., von Wettstein, D., Molec. gen. Genetics, 104 /1969/ 124.
- 40/ Nilsson-Tillgren, T., Molec.gen.Genetics, 105 /1969/ 191.
- 41/ Nilsson-Tillgren, T., Molec.gen.Genetics, 109 /1970/ 246.
- 43/ Nilsson-Tillgren, T., Kielland, M.C., Bekker, B., Molec. gen. Genetics, 128 /1974/ 157.
- 44/ Oxelfelt, P., Phytopath. Z. 69 /1970/ 202.
- 45/ Oxelfelt, P., Phytopath. Z. 71 /1971/ 247.
- 46/ Paterson, R., Knight, C.A., Virology, 64 /1975/ 10.
- 47/ Randles, J.W., Virology, 36 /1958/ 556.
- 48/ Reaney, D.C., J. Theor. Biol. 49 /1975/ 461.
- 49/ Rogers, M.E., Loening, U.E., Fraser, R.S.S., J.Mol. Biol. 49 /1970/ 681.
- 50/ Rohringer, R., Samborski, D.J., Person, C.O., Can.J.Bot. 39 /1961/ 775.
- 51/ Sakai, F., Takebe, I., Virology, /1972/ .
- 52/ Sakai, F., Takebe, I., Virology, 62 /1974/ 426.
- 53/ Sela, I., Hauschner, A., Virology, 64 /1975/ 284.
- 54/ Siegel, A., Zaitlin, M., Duda, C., Virology, 53 /1973/ 75.
- 55/ Solymosy, F., Lázár, G., Bagi, G., Anal. Biochem. 38, /1970/ 40.
- 56/ Spangler, V.L., Iglewski, W.J., J. Virology, 9 /1972/ 56.

- 57/ Takebe, I., Otsuki, Y., Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 64,
/1969/ 843.
- 58/ Udvardy, J., Farkas, G.L., Marz e, G., Plant Cell Physiol.
10 /1969/ 375.
- 59/ Vande,Woude, G.F., Polatnick, J., Ascione, R., J. Virol.
5 /1970/ 458.
- 60/ Watanabe, H., Watanabe, M., J. Virology, 2 /1968/ 1400.
- 61/ Wilson, C.H., Ann.Rev.Plant Physiol. 26 /1975/ 187.
- 62/ Wyen, N.V., Udvardy, J., Solymosy, F., Marre, E.,
Farkas, G.L., Biochim. Biophys. Acta, 191 /1969/588.
- 63/ Wyen, N.V., Erdei, S., Farkas, G.L., Biochim. Biophys.
Acta, 223 /1971/ 472.
- 64/ Wyen, N.V., Erdei, S., Bagi, G., Farkas, G.L., J. Exp.
Botany, 23 /1972/ 37.
- 65/ Zaitlin, M., Spencer, D., Whitfeld, P., In: "Proceed-
ings of the Int. Symp. on the Plant Biochemical
Regulation in Viral and Other Deasese or Injury"
/T.Hirai, Z. Hikada, I. Uritani, eds/, 1968.
- 66/ Zaitlin, M., Hariharasubramanian, V., Virology, 47
/1972/ 296.
- 67/ Zaitlin, M., Duda, C., Petti, M., Virology, 47 /1973/
300.
- 68/ Zimmern, D., Nucleic Acids Research, 2 /1975/ 1189.
- 69/ Yamazaki, J., Virology, 37 /1969/ 429.



borcis 1/1